

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Valeurs toxicologiques de référence

La microcystine-LR

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Janvier 2019 - Édition scientifique

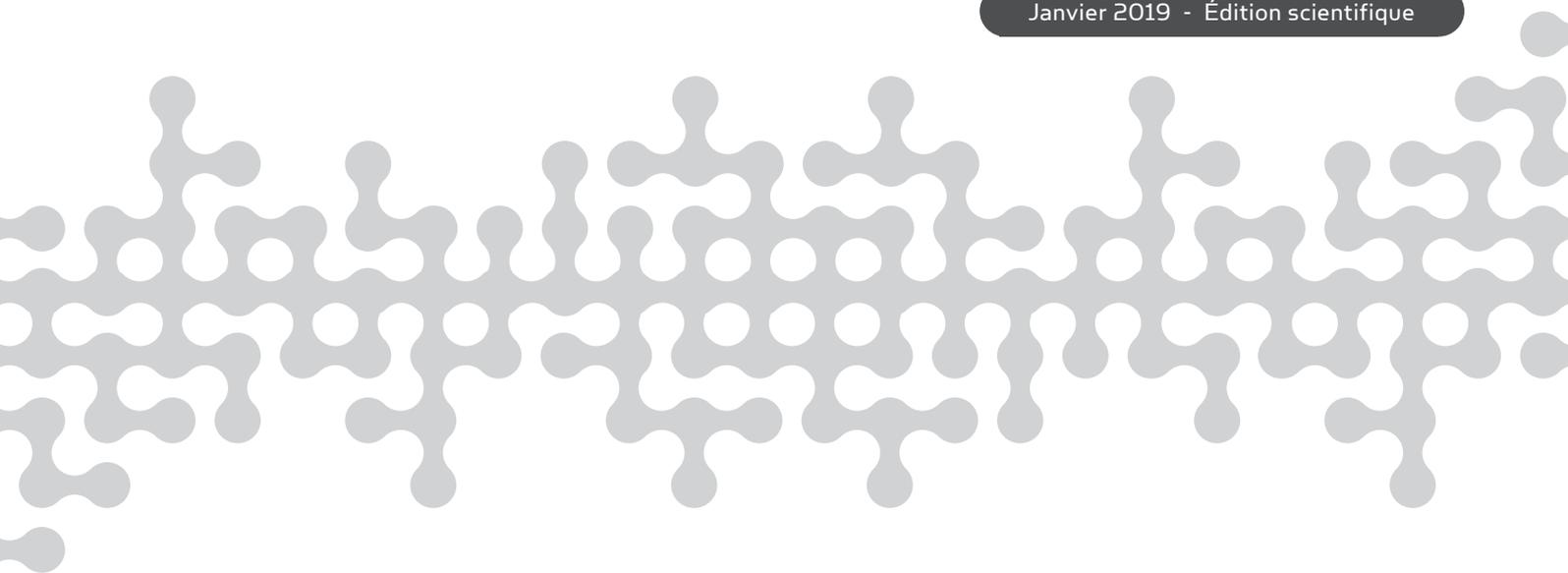


Valeurs toxicologiques de référence

La microcystine-LR

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Janvier 2019 - Édition scientifique



Le directeur général

Maisons-Alfort, le 7 janvier 2019

AVIS
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,
de l'environnement et du travail

relatif à la proposition de VTR par voie orale pour la microcystine-LR
(CAS n°101043-37-2)

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 19 juillet 2016 par la Direction générale de la santé (DGS) afin d'actualiser ses travaux relatifs à l'évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à la consommation humaine (EDCH), à la baignade et autres activités récréatives (saisine n° 2016-SA-0165).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Dans le cadre de l'instruction de la saisine portant sur l'évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à la consommation humaine (EDCH), à la baignade et autres activités récréatives il est apparu nécessaire d'actualiser le corpus documentaire relatif à la toxicité des cyanotoxines.

Deux toxines ont été identifiées par les experts comme nécessitant un travail spécifique. Compte tenu de sa mission pérenne en matière d'élaboration de valeurs toxicologiques de référence (VTR), et afin de répondre aux termes de cette saisine, l'Anses a décidé de procéder à l'élaboration d'une VTR pour ces deux toxines : la microcystine-LR (CAS n°101043-37-2) [désignée MC-LR dans la suite de cet avis] et la cylindrospermopsine (CAS n°143545-90-8). C'est dans la même logique de mission pérenne que le résultat de ce travail est publié dans le cadre de deux avis distincts et spécifiques de l'Agence.

Le présent avis a donc pour objet de produire une proposition de VTR subchronique par voie orale pour la MC-LR. Cette VTR sera reprise et utilisée au cours de l'expertise de l'Agence portant plus globalement sur les risques sanitaire liés à la présence de cyanobactéries (saisine 2016-SA-0165).

Une VTR est un indice toxicologique qui permet de qualifier ou de quantifier un risque pour la santé humaine. Elle établit le lien entre une exposition à une substance toxique et l'occurrence d'un effet sanitaire indésirable. Les VTR sont spécifiques d'une durée d'exposition (aiguë, subchronique ou chronique) et d'une voie d'exposition (orale ou respiratoire). La construction des VTR diffère en fonction des connaissances ou des hypothèses formulées sur les mécanismes d'action des substances. Actuellement, l'hypothèse par défaut est de considérer une relation monotone entre l'exposition, ou la dose, et l'effet, ou la réponse. En l'état actuel des connaissances et par défaut, on considère généralement que, pour les effets non cancérigènes, la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose (Anses, 2017).

En pratique, la construction de la VTR comprend les étapes suivantes :

- recenser et analyser les données de toxicité disponibles, sur la base d'études épidémiologiques et/ou expérimentales,
- identifier le ou les organes cibles et l'effet critique ;
- identifier l'hypothèse de construction, à seuil ou sans seuil de dose, en fonction du mode d'action de la substance,
- choisir une étude clé de bonne qualité scientifique permettant généralement d'établir une relation dose – réponse ;
- définir une dose critique chez l'Homme ou l'animal à partir de cette étude, éventuellement dans le cas d'une dose critique obtenue chez l'animal, ajuster cette dose à l'Homme ;
- pour une VTR à seuil, appliquer des facteurs d'incertitude à cette dose critique de manière à dériver une VTR applicable à l'ensemble de la population concernée ;
- pour une VTR sans seuil, réaliser une extrapolation linéaire à l'origine afin de déterminer un excès de risque unitaire.

L'élaboration des VTR suit une approche très structurée et exigeante qui implique des évaluations collectives par des groupes de spécialistes.

Parmi les cyanotoxines, la MC-LR est l'un des 246 variants identifiés à ce jour de la microcystine. Il s'agit du variant le plus souvent observé dans les masses d'eau et le plus étudié à ce jour. Une recherche bibliographique effectuée *via* les bases de données Scopus et Pubmed a permis d'identifier plus de 5000 articles relatifs à la MC-LR publiés depuis les travaux précédents de l'Agence sur la thématique des cyanotoxines (Afssa-Afsset, 2006). Après une sélection d'une quarantaine d'études jugées robustes par les experts, quinze études de bonne qualité scientifique permettant d'établir une relation dose-réponse pour la substance considérée ont été retenues. L'une d'entre elle a conduit à la construction d'une valeur toxicologique de référence (VTR) représentative de scénarios d'exposition liés à l'ingestion d'EDCH ou d'eau pendant les activités aquatiques récréatives. Une VTR subchronique par voie orale liée à l'ingestion de microcystine-LR (MC-LR) est ainsi proposée dans le présent avis.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise collective a été réalisée par le comité d'experts spécialisé (CES) « Valeurs sanitaires de référence ». Les travaux ont été présentés au CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques. Trois rapporteurs ont été nommés, le premier pour évaluer les études toxicologiques relatives au statut génotoxique de la MC-LR, le second pour évaluer les études portant sur la neurotoxicité de la MC-LR, et le troisième pour évaluer les études relatives aux effets de la MC-LR

sur la reproduction et le développement. Les travaux ont été adoptés par le CES « Valeurs sanitaires de référence » réuni le 18 octobre 2018.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet du ministère en charge des solidarités et de la santé (<https://dpi.sante.gouv.fr>).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

■ Synthèse des données toxicologiques

Les seules données toxicologiques relatives à la MC-LR disponibles à ce jour sont issues d'études réalisées chez l'animal.

- Toxicocinétique

L'absorption de la MC-LR est réalisée par diffusion facilitée *via* des récepteurs de la famille des polypeptides transporteurs d'anions organiques (OATP) (Fischer *et al.*, 2010). Après exposition orale, l'absorption de la MC-LR a été observée principalement au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle (Ito et Nagai, 1997, 2000).

La distribution vers les autres organes et tissus cibles de la toxine se ferait également par les OATP (Komatsu *et al.*, 2007 ; Jasionek *et al.*, 2010 ; Feurstein *et al.*, 2010). Après ingestion, la MC-LR est retrouvée chez le rongeur au niveau du foie, des poumons, des reins (Nishiwaki *et al.*, 1994 ; Ito et Nagai, 1997, 2000) mais également au niveau des tissus cérébraux et reproducteurs (Li *et al.*, 2012b ; Wang *et al.*, 2013a).

Aucune étude par voie orale n'a permis de décrire le métabolisme de la MC-LR. Les données disponibles suggèrent que la MC-LR est conjuguée au glutathion (GSH) puis à la cystéine pour augmenter sa solubilité et faciliter l'excrétion de la molécule (Kondo *et al.*, 1996 ; Guo *et al.*, 2015).

Aucune étude n'a permis de recenser des informations sur l'excrétion de la MC-LR après exposition par voie orale. Les données concernant l'excrétion de la MC-LR montrent une élimination biphasique dans le sang (Falconer *et al.*, 1986, Robinson *et al.*, 1991), une excrétion par la bile (Pace *et al.*, 1991 ; Stotts *et al.*, 1997a et b) et par les urines et fécès (Lowe *et al.*, 2012 ; Sedan *et al.*, 2015).

- Toxicité aiguë

Après une exposition aiguë à la MC-LR par voie orale, des DL₅₀ de 3 à 10 mg.kg⁻¹ sont rapportées chez le rongeur (Fitzgeorges *et al.* 1994 ; Yoshida *et al.*, 1997).

Les effets observés chez l'animal ont lieu principalement au niveau du foie : altérations histologiques tels que la nécrose de la région centrolobulaire, la vacualisation et la stéatose (Yoshida *et al.*, 1997, Ito *et al.*, 1997a ; Fawell *et al.*, 1999 ; Heinze *et al.*, 1999 ; Sedan *et al.*, 2015).

- Irritation

Une étude unique a montré des effets irritants et sensibilisants chez le cochon d'Inde et le lapin, respectivement, suite à une exposition cutanée à la MC-LR (Torokne *et al.*, 2001). La sensibilisation a été jugée modérée à sévère mais aucune corrélation entre l'intensité de la réaction de sensibilisation et la concentration en MC-LR n'a été mise en évidence. Tous les échantillons ont induit une irritation oculaire et cutanée négligeable à légère chez les lapins. Sur la

base d'une seule étude, il n'est pas possible de statuer sur l'effet de la MC-LR sur l'irritation et la sensibilisation.

- Toxicité subchronique et chronique

Chez l'animal, l'exposition subchronique et chronique à la MC-LR par voie orale induit :

- Des effets hépatiques : hépatomégalie, inflammation chronique, dégénérescence des hépatocytes (Ito *et al.*, 1997b, Fawell *et al.*, 1999, Zhang *et al.*, 2012 ; He *et al.*, 2017) ;
- Des effets pulmonaires : augmentation de l'épaisseur du septum alvéolaire, rupture de l'intégrité des jonctions cellulaires (Li *et al.*, 2016 ; Wang *et al.*, 2016) ;
- Des modifications du profil métabolique et biochimique sérique : augmentation des transaminases, diminution du taux de protéines totales (Fawell *et al.*, 1999, He *et al.*, 2017) ;
- Des effets sur le système nerveux : altération des fonctions cognitives, lésions histologiques, dommages oxydatifs, neuro-inflammation (Li *et al.*, 2012b ; Li *et al.*, 2014a et b ; Li *et al.*, 2015c).

- Reprotoxicité et effets sur le développement

Chez le rongeur, plusieurs études récentes indiquent que l'exposition à la MC-LR par voie orale induit :

- Une altération de la qualité spermatique : diminution du compte spermatique, tératospermie et diminution de la motilité spermatique (Chen *et al.*, 2011 ; Chen *et al.*, 2017) ;
- Une modification des concentrations hormonales sériques : diminution du taux de testostérone, augmentation des taux d'hormones lutéinisante et folliculostimulante (Chen *et al.*, 2011) ;
- Des lésions histologiques au niveau des testicules : destruction des cellules de Leydig et de Sertoli, fibrose, atrophie testiculaire (Chen *et al.*, 2011 ; Chen *et al.*, 2016b, 2017 ; Zhang *et al.*, 2017b) ;
- Des modifications au niveau des ovaires : atrésie des follicules, diminution du nombre de follicules primordiaux, primaires, secondaires et antraux (Wu *et al.*, 2015).

Concernant les effets sur le développement, certaines études chez l'animal exposé à la MC-LR par voie orale montrent sur la descendance des retards dans l'ossification du squelette, un poids corporel inférieur par rapport aux témoins et une perturbation du développement de la prostate (Fawell *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2017). Une augmentation du taux de mortalité à la naissance a également été mise en évidence (Wu *et al.*, 2015).

- Génotoxicité

La mutagénèse et la génotoxicité de la MC-LR ou d'extraits de cyanobactéries microcystiques (MCE) ont été évaluées selon divers protocoles d'essais (bactéries, cellules, animaux). Ces derniers mesurent différents paramètres biologiques ou « endpoints » (altérations primaires de l'ADN, mutations géniques et chromosomiques) selon des conditions expérimentales très hétérogènes (méthode, niveau et temps d'exposition). Les résultats de tests *in vitro* d'altérations primaires de l'ADN, dont les effets ont été considérés comme significatifs par leurs auteurs, ne permettent pas de les associer à une génotoxicité intrinsèque de la MC-LR. Il n'y a pas de preuve non plus à ce jour d'un mode d'action génotoxique de type oxydatif de la MC-LR. Les résultats des tests des comètes *in vivo*, tests d'altération primaire de l'ADN, ne permettent pas de conclure quant à l'existence d'un effet génotoxique de la MC-LR *in vivo*, ni par voie orale, ni par voie intrapéritonéale.

A l'issue d'une analyse critique de l'ensemble des données sur la génotoxicité de la microcystine-LR s'appuyant sur une méthodologie de type « poids de la preuve », le CES

conclut à l'impossibilité de conclure sur le caractère génotoxique ou non de la microcystine-LR.

- Cancérogénicité

Les données de cancérogénèse concernant l'exposition à la MC-LR par voie orale sont peu nombreuses et ne permettent pas de statuer sur un potentiel effet cancérogène. Toutefois, le CIRC (Centre international de recherche sur le cancer) a classé la MC-LR comme possiblement cancérogène pour l'Homme (Groupe 2B) sur la base d'études *in vivo* par voie intrapéritonéale (CIRC, 2010).

■ VTR Subchronique

- Choix de l'effet critique

In vivo, l'exposition à la MC-LR par voie orale (eau de boisson ou gavage) a montré divers effets. La MC-LR a d'abord été caractérisée au fil des études comme une hépatotoxine. De nombreuses études ces dernières années ont mis en évidence également d'autres effets néfastes : reprotoxicité, neurotoxicité, toxicité pulmonaire, cancérogénicité, etc. A l'issue de l'analyse de l'ensemble des études dont notamment celles qui ont conduit à définir des NOAEL¹/LOAEL² inférieurs à 40 µg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (plus faible NOAEL retenue pour des effets hépatotoxiques par les différents organismes internationaux pour élaborer des VTR), le CES a retenu l'altération de la qualité spermatique comme effet critique. Les effets sur la reproduction les plus pertinents sont observés au niveau de l'appareil reproducteur mâle. Enfin, quelques effets sur la fertilité féminine ont été observés chez la souris et le rat. Le choix de cet effet critique permet de protéger de l'ensemble des effets néfastes liés à une exposition par voie orale à la MC-LR au regard des faibles doses auxquelles la reprotoxicité est observée.

Au vu des études récentes mettant en évidence des effets de la MC-LR sur la reproduction chez le rongeur par voie orale et de la gamme des doses d'exposition très basses à laquelle les effets surviennent, le CES retient comme effet critique pertinent pour l'homme l'altération de la qualité spermatique. Cette altération comprend : une diminution de la mobilité spermatique, du nombre de spermatozoïdes et l'augmentation du nombre d'anomalies spermatiques.

- Analyse des VTR subchroniques existantes

Les différentes VTR subchroniques proposées à ce jour se basent sur trois études (Fawell *et al.*, 1994 ; Heinze *et al.*, 1999 ; Kuiper-Goodman *et al.*, 1999). Elles mettent en évidence des effets néfastes observés au niveau hépatique et proposent des LOAEL/NOAEL supérieurs à 40 µg.kg pc⁻¹.j⁻¹. Au vu du nombre d'études sur la toxicité par voie orale (*via* l'eau de boisson ou par gavage) chez le rongeur publiées ces dernières années démontrant l'apparition d'effets néfastes (notamment une hépatotoxicité, reprotoxicité et neurotoxicité) à des doses d'exposition égales ou inférieures à la NOAEL actuel de 40 µg.kg pc⁻¹.j⁻¹, il apparaît nécessaire d'établir une VTR subchronique plus protectrice permettant ainsi de couvrir tous les autres effets mis en évidence récemment lors d'une exposition subchronique à de faibles doses de MC-LR par voie orale.

¹ NOAEL : no observed adverse effect level (dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste observé)

² LOAEL : lowest observed adverse effect level (dose minimale entraînant un effet néfaste observé)

Ainsi, compte tenu de ces observations, le CES ne retient pas les VTR existantes et propose de construire une VTR subchronique par voie orale plus protectrice.

- Construction d'une VTR subchronique
 - Choix de l'étude clé

Cinq études (Chen *et al.*, 2011 ; Chen *et al.*, 2015 ; Wu *et al.* 2015 ; Chen *et al.*, 2017 ; Zhang *et al.* 2017b) s'avèrent de bonne qualité, et certaines sont classées 1 selon la cotation de Klimisch.

Parmi toutes les études, le CES a décidé de retenir comme étude clé celle de Chen *et al.* (2011) au regard de la qualité de l'étude (classée 1 selon la classification de Klimisch), de la gamme de doses étudiées relativement basses (0 ; 1 ; 3,2 et 10 µg.L⁻¹), de l'existence d'une relation dose-réponse pour plusieurs effets reprotoxiques (qualité spermatique, augmentation du taux de LH/FSH et diminution du taux de testostérone). Il s'agit également de l'étude dans laquelle les effets reprotoxiques surviennent à la dose la plus faible (3,2 µg.L⁻¹ soit 0,48 µg.kg pc⁻¹.j⁻¹).

- Choix de la dose critique

Les préconisations méthodologiques suggèrent de privilégier la construction d'une Benchmark Dose (BMD) chaque fois que les données disponibles le permettent, de retenir une NOAEL en second choix et une LOAEL en dernière option (Anses, 2017).

Une BMD a pu être modélisée à partir d'une relation dose-réponse entre la diminution de la mobilité spermatique et l'exposition quotidienne à la MC-LR durant 3 mois (cf. annexe 5). Néanmoins le ratio BMD/BMDL est supérieur à 10 et la BMD obtenue est 14 fois plus basse que la première dose expérimentale testée. Or, d'après les recommandations du logiciel BMDS Wizard développé par ICF International (ICF BMDS Wizard), un ratio BMD/BMDL supérieur à 5 et une BMD plus de trois fois plus petite que la première dose expérimentale testée suggèrent un manque de robustesse de la modélisation obtenue. Il a donc été décidé de ne pas retenir cette BMDL et de retenir la NOAEL.

$$\text{NOAEL} = 1 \mu\text{g.L}^{-1}$$

Cette NOAEL correspond à une concentration de MC-LR dans l'eau. Un facteur de conversion de 0,15 recommandé par l'EFSA (EFSA, 2012)³ a été utilisé par défaut pour obtenir une dose quotidienne d'exposition subchronique chez la souris.

$$\text{NOAEL} = 0,15 \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$$

- Ajustement allométrique

Pour réduire la valeur de l'incertitude sur la variabilité inter-espèce, un ajustement allométrique a été réalisé. Une dose équivalente humaine (HED = Human Equivalent Dose) est calculé à l'aide de l'équation suivante⁴ :

$$\text{Dose équivalente Homme} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids homme}} \right)^{1/4}$$

En l'absence de données moyennes concernant le poids des souris de l'étude, un poids moyen de 25 g a été utilisé, comme préconisé par l'US EPA (US EPA, 2006). Celui utilisé pour l'Homme pour le calcul est de 70 kg.

$$\text{NOAEL}_{\text{HED}} = 0,15 \times (0,025 / 70)^{1/4} = 0,02 \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$$

³ Ce facteur a été établi par le NTP à partir de 8 études de toxicité dans lesquelles figuraient la consommation d'eau de boisson et le poids corporel des animaux testés (rats ou souris).

⁴ Cette équation est issue des recommandations de l'US EPA (US EPA, 2006).

o Choix des facteurs d'incertitude

Le calcul de la VTR à partir de Chen *et al.* (2011) a été effectué à l'aide des facteurs d'incertitude suivants (Anses, 2017) :

- Variabilité inter-espèces (UF_A) : 2,5. L'ajustement dosimétrique réalisé a permis de calculer une dose équivalente humaine, à l'aide de l'équation précédente. Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixé à 2,5 selon les recommandations de l'IPCS (IPCS, 2005) et sur la base des pratiques de l'Anses.
- Variabilité inter-individuelle (UF_H) : 10. En l'absence de connaissance sur l'existence de sous-population sensible, une valeur finale de 10 par défaut a été choisie pour la variabilité intra-espèce.

Un facteur d'incertitude global de 25 est donc utilisé pour la construction de la VTR.

o Proposition de VTR subchronique

$$\text{VTR} = \text{NOAEL}_{\text{HED}} / \text{UF} = 0,02 / 25 = 0,0008 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc.j}^{-1} \sim 1 \text{ ng.kg}^{-1} \text{ pc.j}^{-1}$$

o Niveau de confiance

Un niveau de confiance global **moyen/fort** a été attribué à cette VTR en se basant sur les 4 critères suivants : la nature et la qualité des données (fort), le choix de l'effet critique et le mode d'action (moyen-fort), le choix de l'étude clé (moyen) et le choix de la dose critique (moyen-fort).

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail adopte les conclusions et recommandations du CES « Valeurs sanitaires de référence » qui portent sur la proposition de valeurs toxicologiques de référence par voie orale pour la microcystine-LR.

Pour rappel, dans le cadre des VTR et en lien avec les scénarios généralement pris en compte en évaluation des risques sanitaires chez l'Homme, l'Anses distingue trois types de durée d'exposition :

- Pour les expositions aiguës, de 1 à 14 jours ;
- Pour les expositions subchroniques, de 15 à 364 jours ;
- Pour les expositions chroniques, à partir de 365 jours.

Concernant la VTR subchronique, l'Agence retient la valeur de $1 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{pc.j}^{-1}$ (cf. tableau 1).

Tableau 1 : VTR subchronique par voie orale pour la microcystine-LR

Effet critique (étude clé)	Concentration critique	UF	VTR
Altération de la qualité spermatique Chen <i>et al.</i> (2011)	NOAEL = 1 µg.L ⁻¹ = 0,15 µg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹	25	1 ng.kg pc⁻¹.j⁻¹
	<u>Ajustement allométrique</u> NOAEL _{HED} = 0,02 µg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹	UF _A : 2.5 UF _D : 10	Indice de confiance Moyen/ fort

L'Agence rappelle qu'en l'état des connaissances actuelles, il n'est pas possible de conclure sur le caractère génotoxique de la MC-LR ni sur son caractère cancérigène.

Enfin, l'Agence signale que la VTR construite ne se rapporte qu'à la MC-LR. Par conséquent, l'Agence souligne la nécessité d'acquérir des connaissances relatives à la toxicité potentielle d'autres variants de la microcystine car ces derniers pourraient présenter des propriétés toxiques équivalentes ou supérieures à celles de la MC-LR (identification des toxines nouvelles, réalisation d'essais de toxicité subchronique et chronique, réalisation d'essais d'évaluation de la cancérogénicité, *etc.*).

Dr Roger Genet

MOTS-CLÉS

Valeur toxicologique de référence, VTR, microcystine-LR, 101043-37-2, oral exposure, subchronique, reprotoxicité

Toxicological reference value, TRV, microcystin-LR, 101043-37-2, oral exposure, subchronic, chronic, reproduction toxicity

Valeurs toxicologiques de référence (VTR)

**Elaboration de VTR subchronique par voie orale pour la microcystine-LR
(CAS n° 101043-37-2)**

Mission permanente « Valeurs toxicologiques de référence »

Dossier 2016-SA-0297

**Saisines liées 2001-SA-0035, 2015-SA-0206, 2015-SA-0207
2016-SA-0165**

RAPPORT d'expertise collective

Comité d'experts spécialisé

**« Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de
référence »**

Octobre 2018

Mots clés

Valeur toxicologique de référence, VTR, cyanobactéries, microcystine-LR, subchronique, reprotoxicité

Key words

Toxicological reference value, TRV, cyanobacteria, microcystin-LR, subchronic, reproductive toxicity



Présentation des intervenants

PRÉAMBULE : Les experts externes, membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

COMITE D'EXPERTS SPÉCIALISE

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis et adoptés par le CES suivant :

- CES « Valeurs sanitaires de référence » – 2017-2020

Président

M. Fabrice MICHIELS – Médecin du travail / toxicologue à l'Association Interentreprises pour la Santé au Travail 19 – Compétences : Médecine du travail, toxicologie

Membres

M. Marc BARIL – Professeur associé à l'Université de Montréal – Compétences : Chimiste toxicologue, hygiène industrielle

M. Stéphane BINET – Pharmacien toxicologue à la direction scientifique à l'INRS – Compétences : toxicologie générale et industrielle

Mme Michèle BISSON – Responsable d'étude à l'INERIS – Compétences : Pharmacien toxicologue, toxicologie générale

Mme Anne CHEVALIER – Retraitée de l'Institut de Veille Sanitaire - Compétences : épidémiologie

Mme Fatiha EL-GHISSASSI – Scientifique, Section des Monographies du CIRC (IMO) Centre International de Recherche sur le Cancer - Compétences : biochimie spécialiste en cancérogénèse et génotoxicité

Mme Mounia EL-YAMANI – Responsable d'unité à Santé publique France – Compétences : biochimie, toxicologie

M. Claude EMOND – Professeur adjoint de clinique à l'Université de Montréal – Compétences : Toxicologie, modèle PBPK, toxicocinétique, nanotoxicologie, perturbateurs endocriniens

M. Rex FITZGERALD – Expert en toxicologie réglementaire au Centre Suisse de Toxicologie Humaine Appliquée - Compétences : toxicologie de la reproduction, neurotoxicité du développement, évaluation des risques humains

M. Robert GARNIER – Médecin toxicologue, Centre antipoison de Paris - Compétences : Toxicologie médicale, médecine du travail

Mme Perrine HOET – Professeur à l'Université Catholique de Louvain. IREC – Compétences : médecine, toxicologie industrielle et environnementale

Mme Yuriko IWATSUBO – Médecin épidémiologiste à Santé publique France – Compétences : épidémiologie des risques professionnels

Mme Cécile KAIRO – Évaluateur de risques sanitaires à Santé publique France - Compétences : Docteur en pharmacie spécialisé en environnement, toxicologie générale et évaluation des risques

Mme Laila LAKHAL – Ingénieur INRA unité Toxalim - Compétences : Toxicologie, métabolisme, perturbateurs endocriniens

M. Frédéric LIRUSSI – Maître de Conférences des Universités– Praticien Hospitalier (MCU-PH) à l'UFR des Sciences de Santé & CHU de Dijon - Compétences : Toxicologie Clinique, Toxicologie analytique, Immunité Innée, Reprotoxicité

Mme Anne MAITRE – Professeur des Universités – Praticien Hospitalier (PU-PH) au Laboratoire de Toxicologie Professionnelle et Environnementale, CHU de Grenoble ; Responsable de l'équipe « Environnement et prédiction de la santé des populations », Laboratoire TIMC, Université Grenoble Alpes – Compétences : médecine, toxicologie, IBE, métrologie des polluants, hygiène industrielle

Mme Florence PILLIERE – Conseiller médical en toxicologie à l'INRS – Compétences : médecine du travail, toxicologie, IBE

Mme Anne PLATEL – Maître de conférences à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille – Laboratoire de Toxicologie Génétique, Institut Pasteur de Lille - Compétences : Toxicologie, Génotoxicité, QSAR

M. Henri SCHROEDER – Enseignant chercheur à la Faculté des Sciences et Technologies de l'Université de Lorraine à Vandoeuvre-les-Nancy – Laboratoire CALBINOTOX, EA 7488 - Pharmacien neurobiologiste - Compétences : Neurotoxicité, polluants environnementaux, comportement animal, développement cérébral, exposition périnatale

M. Olivier SORG – Chef de groupe de recherche à l'Université de Genève - Compétences : Docteur es science en biochimie, toxicologie expérimentale, dermatotoxicologie

M. Jérôme THIREAU – Chargé de recherche au CNRS - Compétences : Docteur es science, physiologie animale, biologie cellulaire, cardiotoxicité

M. Claude VIAU – Professeur associé à l'université de Montréal – Compétences : Toxicologie, IBE, hygiène industrielle, métrologie des polluants

M. Raymond VINCENT - Retraité (anciennement Chargé de mission à la Direction Déléguée aux Applications (INRS)) - Compétences : chimie, métrologie des polluants, évaluation des risques professionnels

RAPPORTEURS

M. Frédéric LIRUSSI – Maître de Conférences des Universités– Praticien Hospitalier (MCU-PH) à l'UFR des Sciences de Santé & CHU de Dijon - Compétences : Toxicologie Clinique, Toxicologie analytique, Immunité Innée, Reprotoxicité

M. NESSLANY – Chef du service toxicologie – Institut Pasteur de Lille - Compétences : Génotoxicité

M. Henri SCHROEDER – Enseignant chercheur à la Faculté des Sciences et Technologies de l'Université de Lorraine à Vandoeuvre-les-Nancy – Laboratoire CALBINOTOX, EA 7488 - Pharmacien neurobiologiste - Compétences : Neurotoxicité, polluants environnementaux, comportement animal, développement cérébral, exposition périnatale

PARTICIPATION ANSES

Coordination et contribution scientifique

Mme Nathalie ARNICH – adjointe au responsable de l'unité évaluation des risques liés aux aliments.

Mr Laurent BODIN – chef de projets scientifiques – unité d'évaluation des substances chimiques.

Mme Carole CATASTINI – chef de projets scientifiques – unité d'évaluation des risques liés à l'eau.

Mme Esther CHABOT– chargée de projet scientifique - unité d'évaluation des risques liés à l'eau.

Mme Victoria GALLON– stagiaire – unité d'évaluation des risques liés à l'eau.

Mme Pascale PANETIER– responsable de l'unité d'évaluation des risques liés à l'eau.

Secrétariat administratif

Mme Séverine BOIX-PETRE – Anses

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Sigles et abréviations	9
Liste des tableaux	11
Liste des figures	11
1. Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine.....	12
1.1 Contexte	12
1.2 Objet de la saisine	12
1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation	13
1.4 Prévention des risques de conflit d'intérêt	13
2. Informations générales.....	13
2.1 Cyanobactéries	14
2.2 Synthèse des microcystines	15
2.3 Structure et propriétés physico-chimiques de la microcystine-LR	15
3. Synthèse des données toxicologiques.....	17
3.1 Toxicocinétique	17
3.1.1 Absorption	17
3.1.2 Distribution	18
3.1.3 Métabolisme.....	20
3.1.4 Excrétion	22
3.2 Toxicité aiguë et subaiguë	23
3.2.1 Effets aigus et subaigus.....	23
3.2.1.1 Données chez l'Homme	23
3.2.1.2 Données chez l'animal	23
3.2.2 Irritation et sensibilisation	25
3.2.2.1 Données chez l'Homme	25
3.2.2.2 Données chez l'animal	25
3.3 Toxicité subchronique et chronique	25
3.3.1 Données chez l'homme	25
3.3.2 Données chez l'animal.....	25
3.4 Neurotoxicité	27

3.5 Effets sur la reproduction et le développement	28
3.5.1 Données chez l'Homme.....	28
3.5.2 Données chez l'animal.....	28
3.6 Génotoxicité et mutagénéicité	30
3.7 Cancérogénicité	33
3.8 Mécanismes d'action	34
4. Recueil des valeurs toxicologiques de référence	38
4.1 VTR aiguës par voie orale.	38
4.2 VTR subchroniques par voie orale.	38
1.1 VTR chroniques par voie orale	39
1.1.1 VTR à seuil	39
1.1.2 VTR sans seuil pour les effets cancérogènes	39
5. Proposition de VTR subchronique par voie orale	41
5.1 Choix de l'effet critique	41
5.2 Analyse des VTR existantes	42
5.3 Construction de VTR	42
5.3.1 Choix de l'étude clé.....	42
5.3.2 Choix de la dose critique.....	43
5.3.3 Ajustement allométrique	43
5.3.4 Choix des facteurs d'incertitude.....	44
5.3.5 Proposition de VTR subchronique par voie orale	44
5.3.6 Niveau de confiance	44
6. Conclusions du CES	46
Bibliographie	47
ANNEXES	63
Annexe 1 : Lettre de saisine	64
Annexe 2 : Recherche bibliographique complémentaire sur la période 2006 - 2018	66
Annexe 3 : Tableau récapitulatif des études de toxicité de la microcystine-LR <i>in vivo</i> par voie orale chez le rongeur	67
Annexe 4 : Evaluation de la qualité des études de toxicité de la microcystine-LR	70

Annexe 5 : Modélisation d'une Benchmark Dose pour la microcystine-LR à partir de données issues de l'étude de Chen *et al.* (2011)..... 78



Sigles et abréviations

Adda	Acide 3-amino-9-méthoxy-2,6,8-triméthyl-10-phényldeca-4,6-diénoïque
ADME	Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion
ADN/ADNmt	Acide désoxyribonucléique / ADN mitochondrial
ALP	Phosphatase alcaline
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation environnement travail
AQT	Apport Quotidien Tolérable
ARN/ARNm	Acide ribonucléique / ARN messager
BMD	Benchmark Dose
BMDL	Limite inférieure de l'intervalle de confiance de la benchmark dose
BMR	Benchmark Response
BSO	Buthionine sulfoximine
CES	Comité d'Experts Spécialisé
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer
DL50	Dose Létale 50
EDCH :	Eau destinée à la consommation humaine
EFSA	European Food Safety Authority (Autorité européenne de sécurité des aliments)
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ERS	Évaluation de Risques Sanitaires
FSH	Follicle Stimulating Hormone (Hormone folliculo-stimulante)
GSH	γ -L-Glutamyl-L-cystéinyglycine/ Glutathion
GT	Groupe de Travail
HEC	Concentration équivalent humaine (Human Equivalent Concentration)
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Chromatographie en phase liquide à haute performance)
HSP27	Heat Shock Protein 27
INSPQ	Institut National de Santé Publique du Québec
ip	Intrapéritonéale
iv	Intraveineuse
LDH	Lactate Deshydrogénase
LH	Luteinizing Hormone (Hormone Lutéinisante)
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level (Dose minimale entraînant un effet néfaste observé)

MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MC	Microcystine
MC-LR	Microcystine-LR
MCE	Extraits Microcystiques
MDA	Malondialdéhyde
Mdha	N-méthyl-déhydroalanine
MRL	Minimal Risk Level
NHMRC	National Health and Medical Research Council
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level (Dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste observé)
NTP	National Toxicology Program
OATP	Organic-anion-transporting Polypeptide
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OTM	Olive Tail Moment
pc	Poids corporel
PPs	Protéines phosphatases
PP1/PP2A	Protéines phosphatases 1 et 2A
RfC/D	Reference Concentration/Dose
RIVM	National Institute for Public Health and the Environment (Institut national néerlandais pour la santé publique et l'environnement)
SD	Standard Deviation
SOD	Superoxyde dismutase
SPF	Specific Pathogen Free
UF	Facteur d'incertitude (Uncertainty Factor)
UF _A	Facteur d'incertitude inter-espèces
UF _H	Facteur d'incertitude inter-individuel
US EPA	United States Environmental Protection Agency (États-Unis)
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
VTR	Valeur Toxicologique de Référence

Liste des tableaux

Tableau 1 : Identification de la substance et propriétés physico-chimiques (US EPA, 2011 ; INERIS-PSC, 2018).....	15
Tableau 2 : Recensement des valeurs toxicologiques de références par voie orale pour la microcystine-LR39	
Tableau 3 : VTR subchronique par voie orale pour la microcystine-LR.....	46

Liste des figures

Figure 1 : Structure chimique de la MC-LR, avec une leucine (L) et une arginine (R), acides aminés de type L en positions 2 et 4.....	16
Figure 2 : Rôle du glutathion (GSH) dans la détoxification de la microcystine-LR	22

1. Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine

1.1 Contexte

Une valeur toxicologique de référence, ou VTR, est un indice toxicologique qui permet de qualifier ou de quantifier un risque pour la santé humaine. Elle établit le lien entre une exposition à une substance toxique et l'occurrence d'un effet sanitaire indésirable. Les VTR sont spécifiques d'une durée d'exposition (aiguë, subchronique ou chronique) et d'une voie d'exposition (orale ou respiratoire). La construction des VTR diffère en fonction des connaissances ou des hypothèses formulées sur les mécanismes d'action des substances. Actuellement, l'hypothèse par défaut est de considérer une relation monotone entre l'exposition, ou la dose, et l'effet, ou la réponse. En l'état actuel des connaissances et par défaut, on considère généralement que, pour les effets non cancérogènes, la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose (Afsset, 2010).

En pratique, la construction de la VTR à seuil comprend les quatre étapes suivantes :

- choix de l'effet critique ;
- choix d'une étude de bonne qualité scientifique permettant généralement d'établir une relation dose – réponse ;
- choix ou construction d'une dose critique à partir des doses expérimentales et/ou des données épidémiologiques ;
- application de facteurs d'incertitude à la dose critique pour tenir compte des incertitudes.

L'élaboration des VTR suit une approche très structurée et exigeante qui implique des évaluations collectives par des groupes de spécialistes.

1.2 Objet de la saisine

La direction générale de la santé a saisi l'Anses le 19 juillet 2016 d'une demande d'actualisation de l'évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à la consommation humaine (EDCH), à la baignade et autres activités récréatives.

L'un des objectifs de ce travail est d'actualiser le corpus documentaire relatif à la toxicité des cyanobactéries et le cas échéant, sélectionner ou construire de nouvelles valeurs toxicologiques de références représentatives de scénarios d'exposition liés à l'ingestion d'EDCH ou d'eau pendant les activités aquatiques récréatives telle que la baignade. Dans le cadre de cette saisine, une VTR subchronique par voie orale liée à l'ingestion de microcystine-LR est proposée.

1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'Anses a confié au comité d'experts spécialisé (CES) « Eaux » l'instruction de cette saisine. Le CES « Valeurs sanitaires de référence » a été mandaté pour évaluer les VTR existantes et en construire une nouvelle le cas échéant.

Les travaux d'expertise ont été soumis régulièrement aux 2 CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques et tiennent compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres des CES. Les travaux ont été adoptés par le CES « Valeurs sanitaires de référence » réuni le 18 octobre 2018.

Ces travaux sont ainsi issus de collectifs d'experts aux compétences complémentaires.

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) »

1.4 Prévention des risques de conflit d'intérêt

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet du ministère en charge des solidarités et de la santé (<https://dpi.sante.gouv.fr>).

2. Informations générales

2.1 Cyanobactéries

Anciennement appelées « algues bleues » ou « algues bleu-vert », les cyanobactéries sont des micro-organismes procaryotes à Gram négatif dont la pigmentation peut varier du bleu-vert au rouge (De Reviere, 2002 et 2003). Elles sont actuellement présentes dans la plupart des écosystèmes.

Les cyanobactéries sont des procaryotes photosynthétiques, classées du point de vue systématique dans le règne des Eubactéries. À l'instar des autres bactéries, la structure cellulaire des cyanobactéries est caractérisée par l'absence de noyau et d'organites intracellulaires. Ces micro-organismes ont longtemps été rangés dans le règne végétal car ils présentent aussi des caractéristiques propres aux algues en vivant dans les eaux continentales et les milieux marins. Comme les végétaux, les cyanobactéries possèdent de la chlorophylle-a, et non de la bactériochlorophylle comme certaines bactéries. Elles renferment généralement, comme autres pigments photosynthétiques, des phycobiliprotéines et réalisent une photosynthèse productrice d'oxygène en utilisant l'eau comme donneur d'électrons.

La multiplication des cyanobactéries est végétative, c'est-à-dire asexuée, et s'effectue par division binaire d'une cellule mère en deux cellules filles, par bourgeonnement ou par divisions multiples. Selon les espèces et les conditions environnementales, les temps de doublement des populations varient de quelques heures à plusieurs jours.

Dans des conditions qui leur sont favorables, ces cyanobactéries connaissent des phases de prolifération massive aussi qualifiées d'efflorescences (bloom en anglais). Durant ces phases de prolifération massive, se développe une biomasse importante et une ou deux espèces deviennent alors très largement dominantes. Les effets indésirables pour l'environnement et la santé humaine sont alors nombreux.

La présence de cyanobactéries signalée sur tous les continents est source de préoccupation croissante vis-à-vis des risques sanitaires associés pour l'Homme et l'animal (Vichi *et al.*, 2016). En effet, ces micro-organismes peuvent produire et libérer des cyanotoxines ou d'autres composés bio-actifs, capables d'agir sur différents organes cibles tels que le foie et le système nerveux. L'Homme est exposé aux cyanotoxines principalement par ingestion d'eau destinée à la consommation humaine (EDCH ou accidentellement lors d'activités récréatives aquatiques).

2.2 Synthèse des microcystines

Les microcystines (MC) sont les cyanotoxines les plus recherchées en milieu naturel. Elles sont produites par de nombreux genres de cyanobactéries tels que *Microcystis*, *Planktothrix*, (*Oscillatoria*), *Anabaena* ou *Hapalosiphon*. Au sein d'une même espèce de cyanobactérie, on note une hétérogénéité quant à la production de toxines avec des souches toxigènes et non toxigènes. Les microcystines sont synthétisées par les cellules en croissance. La production de ces toxines dépend de la présence de gènes de biosynthèse dont l'expression peut être régulée par des facteurs environnementaux (Schatz *et al.*, 2007), du taux de croissance des cellules et de la disponibilité des nutriments (Briand *et al.*, 2008), de la proportion entre les souches toxiques et non toxiques (Briand *et al.*, 2008) et de l'état physiologique des clones toxiques (Chorus, 2001).

2.3 Structure et propriétés physico-chimiques de la microcystine-LR

Les microcystines constituent un groupe de plus de 250 variants différents de peptides cycliques comprenant 7 acides aminés (Catherine *et al.*, 2017). Elles sont caractérisées par la présence d'un acide aminé Adda [Acide 3-amino-9-méthoxy-2,6,8-triméthyl-10-phényldeca-4,6-diénoïque], caractéristique des cyanobactéries. Des variations structurales apparaissent suite au changement de deux acides aminés ou d'autres changements dans les petits groupes latéraux. Les caractéristiques physico-chimiques de la microcystine-LR disponibles à ce jour ont été recensées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Identification de la substance et propriétés physico-chimiques (US EPA, 2011 ; INERIS-PSC, 2018)

Nom	Microcystine-LR
Numéro CAS	101043-37-2
Abbréviation	MC-LR
Formule	C ₄₉ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₂
Forme physique	Solide
Poids moléculaire	995.17 g/mole
Densité	1.29 g/m ³
Solubilité dans l'eau	Forte
Koc	10000000000 L/kg
Kow	0.7017
Bioaccumulation BCF	3.162

Les microcystines sont très stables dans l'eau et supportent de nombreux changements environnementaux tels que des variations de pH ou de température (jusqu'à 300 °C). Ces molécules sont particulièrement solubles dans l'eau, avec différents degrés de solubilité selon les variants et l'état de détoxication (Harada, 1996 ; Sivonen & Jones, 1999 ; Codd *et al.*, 2005).

La microcystine-LR (MC-LR) est la microcystine la plus commune et la plus largement étudiée des variants de MC, caractérisée par la présence d'une leucine (L) et d'une arginine (R), acides aminés de type L en positions 2 et 4 (Figure 1) (Carmichael, 1988).

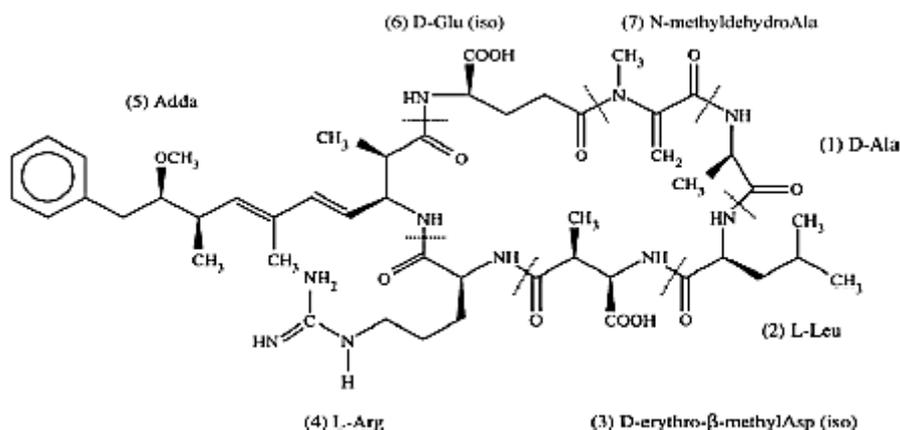


Figure 1 : Structure chimique de la MC-LR, avec une leucine (L) et une arginine (R), acides aminés de type L en positions 2 et 4

3. Synthèse des données toxicologiques

La synthèse des données toxicologiques a été rédigée sur la base des rapports de synthèse réalisés par des organismes reconnus au niveau international (US EPA 2015a et b ; EFSA 2016 ; Santé Canada, 2016) complétée par une recherche bibliographique réalisée sur la période 2006-2018. Le détail de cette recherche bibliographique complémentaire est présenté en Annexe 2.

3.1 Toxicocinétique

Un nombre limité d'études *in vivo* par voie orale décrivant la toxicocinétique des microcystines a été rapporté. Quelques données acquises avec des voies d'administration intrapéritonéale (ip) ou intraveineuse (iv) et des études menées *in vitro* permettent de décrire des paramètres cinétiques et de compléter le profil Absorption Distribution Métabolisme Excrétion (ADME).

3.1.1 Absorption

Au vu des données disponibles à ce jour, il est montré que l'absorption de la MC-LR est réalisée par diffusion facilitée *via* des récepteurs de la famille des polypeptides transporteurs d'anions organiques (OATP). Il s'agit de transporteurs permettant l'absorption de nombreuses molécules par le tractus intestinal ainsi que leur transport vers le foie, le cerveau et de nombreux autres tissus (Cheng *et al.*, 2005 ; Fischer *et al.*, 2005 ; Svoboda, 2011). Ces transporteurs sont retrouvés dans de nombreux organes et permettent aux microcystines d'être absorbées par l'organisme, en traversant la barrière intestinale.

Après avoir exposé par gavage (une dose unique de 500 µg.kg⁻¹) des souris ICR mâles à la MC-LR (purifiée à partir d'un échantillon de cyanobactéries), Ito *et al.* (1997a) et Ito et Nagai (2000) ont étudié l'absorption orale de la molécule par immunohistochimie. Une absorption par l'estomac a été observée, mais la molécule est principalement absorbée par l'intestin grêle (Ito et Nagai, 2000). Les auteurs ont pu observer également une érosion des villosités de l'intestin grêle au niveau de cellules épithéliales de surface.

Dans une étude *in situ*, Dahlem *et al.* (1989) ont exposé des rats à la MC-LR (purifiée à plus de 95%) par voie iléale pour étudier de façon indirecte la biodisponibilité orale. Les animaux exposés par voie iléale à 5 mg.kg pc⁻¹ d'infusion de toxine ont montré des symptômes cliniques tels qu'une respiration difficile et un choc circulatoire. Des signes de toxicité hépatique ont été observés dans les 6 heures qui ont suivi l'exposition. Lorsque les auteurs ont administré cette même dose au niveau de l'anse intestinale isolée, la toxicité hépatique observée est plus faible, suggérant que l'absorption intestinale de la MC-LR pourrait être spécifique à un site bien que les différences de surface d'absorption n'ont pas été prises en compte.

Stotts *et al.* (1997a et b) montrent une absorption orale de la dihydromicrocystine ¹marquée au ³H chez le porc après une exposition de l'anse iléale. Les auteurs ont pu déterminer que la concentration maximale de la toxine dans le sang a été atteinte 90 minutes après l'administration de la dose (75 µg.kg pc⁻¹).

Greer *et al.* (2018) ont évalué chez le porc l'absorption orale de la microcystine-LR pure lors d'une exposition répétée en leur administrant par gavage une dose quotidienne de 0,04 µg.kg pc⁻¹ de toxine durant 13 semaines. La MC-LR n'a pas été détectée dans le sérum chez ces animaux. En revanche, lorsque les porcs sont exposés 5 semaines de plus à 2 µg.kg pc⁻¹.j⁻¹, la MC-LR libre est retrouvée dans le gros intestin et le rein de 2 animaux à des concentrations de 1,4 et 1,9 µg.kg pc⁻¹, respectivement. De plus, la moitié des animaux exposés à cette dose montraient une accumulation de MC-LR liée (26,4 µg) dans le tissu hépatique, soit environ 1,1% de la dose administrée.

3.1.2 Distribution

La distribution de la MC-LR vers les autres organes et tissus semble être réalisée de la même manière que l'absorption, c'est-à-dire par transport facilité *via* les OATP.

Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'inhibition de l'absorption de la MC-LR par les OATP pouvait réduire voire supprimer sa toxicité dans le foie (Runnegar *et al.*, 1981 et 1995 ; Runnegar et Falconer, 1982 ; Hermansky *et al.*, 1990a et b). Des études *in vitro* montrent que des cellules dépourvues d'OATP (HEK293, neurones primaires de souris Balb/c, HepG2) n'absorbent pas la microcystine-LR tandis que l'introduction de ces transporteurs dans les cellules permet l'entrée de la molécule (Komatsu *et al.*, 2007 ; Jasionek *et al.*, 2010 ; Feurstein *et al.*, 2010 ; Fischer *et al.*, 2010).

Lorsque des hépatocytes primaires humains sont transfectés avec des transporteurs OATP (HEK293-AOTP1B1 et HEK293-OATP1B3), puis exposés à la microcystine-LR, une augmentation dose-dépendante de la toxine est observée dans ces cellules contrairement aux HEK293 transfectées avec le vecteur contrôle (résistantes à la MC-LR). En présence d'inhibiteur d'OATP1B3, la cytotoxicité de la MC-LR est atténuée chez les HEK293-OATP1B3, de même que son entrée dans la cellule (Fischer *et al.*, 2010).

Lu *et al.* (2008) ont utilisé des souris dépourvues du transporteur OATP1B2 pour montrer son importance dans le transport de la MC-LR vers le foie. Les auteurs ont observé une hépatotoxicité sévère et des décès chez les souris sauvages exposées à la microcystine-LR par voie intrapéritonéale (ip) (120 µg.kg⁻¹). En revanche, les souris OATP1B2-null ont montré une résistance à cette toxicité induite par la MC-LR.

¹ La dihydromicrocystine ³H (2H MC-LR) a pu être utilisée à la place de la MC-LR dans les études de toxicocinétique anciennes car il était plus facile d'incorporer le tritium dans cette molécule et de façon plus stable que dans la MCLR. En outre la 2H MC-LR a la même cible toxique (le foie) que la MC-LR et donc probablement le même comportement.

Pour démontrer le rôle du transporteur OATP1A5 dans l'absorption de la MC-LR par les neurones sécrétant la GnRH, Ding *et al.* (2017) ont exposé des cellules GT1-7 à la MC-LR. Ils ont pu observer une augmentation du taux d'ARNm d'au moins quatre transporteurs (OATP1A4, OATP1A5, OATP5A1, OATP2B1) dans ces cellules mais seul le taux de protéines de l'OATP1A5 a augmenté. Ils ont aussi montré que la MC-LR ne pouvait pas être transportée dans les cellules déficientes en OATP1A5 qui étaient donc par conséquent protégées d'une diminution de viabilité cellulaire.

La distribution de la microcystine-LR a été étudiée par Ito *et al.* (1997a) et Ito et Nagai (2000) en exposant par gavage des souris ICR mâles (une dose unique de 500 µg.kg pc⁻¹). En plus de l'absorption par l'estomac et l'intestin grêle observé par immunohistochimie, les auteurs ont pu noter également la présence de la toxine dans le plasma sanguin, le foie, les poumons et les reins. Néanmoins, l'érosion des villosités intestinales constatée au cours de l'étude a pu renforcer le passage de la molécule dans la circulation sanguine.

Nishiwaki *et al.* (1994) ont comparé la distribution de la ³H-dihydromicrocystine-LR chez la souris en fonction du mode d'exposition. Après administration unique par voie orale, moins d'1% de la dose administrée est retrouvée dans le foie 6 heures et également 6 jours après l'administration contre 38 % de la dose dans le contenu gastrointestinal. En revanche, on retrouve près de 72 % de la dose dans le foie lorsque la MC-LR est administrée par voie intrapéritonéale, ainsi que 1,4 % dans le petit intestin, 0,5% dans le rein et la vésicule biliaire, 0,4% dans les poumons et 0,3% dans l'estomac.

Lorsque des rats Sprague-Dawley sont exposés à la MC-LR (pure à plus de 95%) par gavage toutes les 48 heures (0,04 ; 0,2 ; 1,0 mg.kg pc⁻¹), la microcystine-LR et ses métabolites (MC-LR-GSH et MC-LR-Cys) ont pu être quantifiés dans le foie des animaux (He *et al.*, 2012). On retrouve dans le foie des animaux du groupe exposé à la plus forte dose un taux de MC-LR de 91,8 ± 25,8 ng.g⁻¹, et de concentrations en MC-LR-GSH et MC-LR-Cys de 13 ± 2 ng.g⁻¹ et 28,5 ± 3 ng.g⁻¹, respectivement.

Sedan *et al.* (2015) ont exposé des souris à la MC-LR (50 ou 100 µg.kg⁻¹ toutes les 48 heures pendant un mois) par gavage et ont pu détecter la présence de la toxine dans le foie des souris exposées. On retrouve en moyenne 1,4% de la dose totale administrée dans le foie des animaux exposés à la plus forte dose et 0,2% chez les animaux traités à 50 µg.kg⁻¹.

Chez la souris gestante, l'exposition maternelle à la MC-LR via l'eau de boisson (10 et 50 µg.L⁻¹), à 12 jours de gestation, et l'exposition des descendants jusqu'au 21^{ème} jour postnatal, entraîne une accumulation de MC-LR dans la prostate ou les testicules des descendants, avec des teneurs encore détectables à 90 jours après la naissance (Zhang *et al.*, 2017a et b).

Des études ont été réalisées sur des vaches laitières et des bovins, mais il est à noter que ces données montrent de nombreuses faiblesses (absence de témoins, faible nombre d'animaux et de concentration d'exposition, manque de données concernant les concentrations en microcystines). Orr *et al.* (2001) ont exposé des vaches laitières à des cellules de *Microcystis aeruginosa* via l'eau d'abreuvement dans le but de rechercher la MC-LR dans le lait des animaux. Celle-ci n'a pas été détectée (limite de détection à 2 ng.L⁻¹). Elle n'est pas détectée non plus après une ingestion des

cellules par capsule à gélatine (Feitz *et al.*, 2002 ; Limite de détection à 0,2 ng.L⁻¹). En revanche, en présence de cellules de *Microcystis aeruginosa* dans l'eau d'abreuvement de bovins durant 29 jours, on retrouve 10-39% de la MC-LR totale ingérée par l'animal dans le foie, mais pas dans le plasma sanguin (Orr *et al.*, 2003).

Certaines études optant pour d'autres voies d'exposition ont permis de caractériser la distribution de la microcystine-LR au sein de l'organisme.

Robinson *et al.* (1989) ont décrit la distribution de la microcystine-LR tritiée (pure à plus de 95%) après une injection intrapéritonéale d'une dose sub létale de 45 µg.kg⁻¹ ou létale de 101 µg.kg⁻¹ chez la souris. Pour les deux doses, on observe une distribution similaire du marquage radioactif (en % de radioactivité totale) après 60 minutes, à savoir une accumulation dans le foie qui atteint un maximum de 60%. Lors de l'exposition à 101 µg.kg⁻¹, les auteurs ont retrouvé 56% de la dose administrée dans le foie, 7% dans l'intestin, 0,9% dans le rein et moins de 1% dans le cœur, la rate et le muscle squelettique. Les mêmes auteurs ont réalisé l'expérience en administrant 35 µg.kg⁻¹ à des souris par voie iv (Robinson *et al.*, 1991). Après une heure, la distribution était de 67% de la dose initiale dans le foie, 8,6% dans le petit intestin, 6% dans la carcasse (corps sans le foie, l'intestin, les reins, le cœur, les poumons et la rate) et 0,8% dans les reins ainsi que des traces dans le plasma. Un fort taux de MC-LR dans les poumons a été retrouvé après 3 minutes, la toxine n'était plus détectable après 10 minutes.

L'accumulation de la MC-LR dans le foie et les reins a pu être observée à de nombreuses reprises à la suite d'études exposant des animaux à la toxine par voie intrapéritonéale (Wang *et al.*, 2008 ; Lowe *et al.*, 2012 ; Huang *et al.*, 2013 ; Sedan *et al.*, 2013 ; Guo *et al.*, 2015 ; Liu *et al.*, 2016a) mais aussi dans la rate (Li *et al.*, 2012a) , l'hippocampe (Li *et al.*, 2012b) et les testicules (Wang *et al.* 2013a).

Zhao *et al.* (2015) ont étudié la distribution de la MC-LR lors d'une exposition prénatale. Des rates SD gestantes ont été exposées avec des pompes à perfusion à 10 µg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (0.25 µL.h⁻¹) de MC-LR du 8^{ème} jour de gestation au 15^{ème} jour postnatal. Les auteurs ont montré une accumulation de la MC-LR dans les cerveaux des descendants suggérant en plus du passage de la molécule vers les tissus cérébraux, un franchissement de la barrière placentaire. Une étude ultérieure a montré l'accumulation de la MC-LR dans le foie des descendants après exposition prénatale (Zhao *et al.*, 2016).

3.1.3 Métabolisme

Les données concernant le métabolisme de la MC-LR sont limitées. Aucune étude par voie orale n'a permis de décrire cette étape. Néanmoins, certaines études *in vitro* et *in vivo* par d'autres voies d'administration apportent des éléments d'information.

Les microcystines peuvent être conjuguées au glutathion (GSH) et à la cystéine pour augmenter leur solubilité et faciliter leur excrétion (Kondo *et al.*, 1996).

Lorsque des souris CD-1 sont exposées à une dose de 35 µg.kg pc⁻¹ de ³H-dihydromicrocystine-LR par voie iv, l'urine et les matières fécales contiennent respectivement 9,2 ± 1,0% et 14,5 ± 1,1% de la dose administrée, et, 60% de cette quantité correspond à la toxine telle qu'administrée.

L'analyse par HPLC a permis de montrer la présence d'autres pics d'intensité plus faible sortant à des temps de rétention différents sur le chromatogramme, suggérant ainsi la présence de métabolites (Robinson *et al.*, 1991). Pace *et al.* (1991) ont aussi détecté dans le foie de rat isolé perfusé la toxine d'origine (^3H -dihydromicrocystine-LR) et un métabolite plus polaire. Cependant, la caractérisation de ces métabolites n'a pas été réalisée dans ces études.

Après injection ip de 4 μg de MC-LR (purifiée à partir de cellules provenant d'une efflorescence cyanobactérienne) chez le rat, Kondo *et al.* (1992, 1996) ont isolé des conjugués et observé une modification structurale des groupes Adda et Mdha (N-méthyl-déhydroalanine) de la MC-LR. Il a aussi été mis en évidence que ces groupes Adda et Mdha représentaient des sites propices à l'oxydation facilitée par le CYP450 et à la conjugaison avec le GSH ou la cystéine.

Takenaka (2001) a montré que les conjugués de MC-LR au GSH étaient formés par les enzymes de glutathion S-transférase (GST) du cytosol du foie de rats et dans les microsomes. Cette conjugaison a été également caractérisée *in vitro* par Buratti *et al.* (2011) en mettant la MC-LR (pure à plus de 95%, isolée de *Microcystis aeruginosa*) en présence de cinq GST recombinantes humaines (A1-1, A3-3, M1-1, P101 et T1-1). Les cinq enzymes ont pu catalyser la conjugaison, mais avec des relations dose-réponse différentes. Cette réaction était dépendante de la concentration en glutathion, du pH et de la température.

Il a été rapporté une différence d'efficacité catalytique de la conjugaison de la MC-LR au GSH entre les humains et les rongeurs. Les rongeurs montrent une meilleure affinité au substrat, induisant une efficacité deux fois plus élevée de la réaction catalytique (Buratti et Testai, 2015).

Li *et al.* (2015a) ont exposé des rats SD à la MC-LR (pure à plus de 95%) par voie ip (0,25 ou 0,5 fois la dose létale 50 (DL_{50}) de $82,7 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ déterminée dans l'étude). Pour déterminer le rôle de la GSH dans l'hépatotoxicité induite par la MC-LR, certains rats ont été prétraités au Buthionine sulfoximine (BSO), un inhibiteur de la synthèse de GSH. Les animaux prétraités au BSO et exposés à la toxine montrent plus de dommages hépatiques et une accumulation de la MC-LR et de ses conjugués. Néanmoins, les taux de MC-LR-GSH et MC-LR-Cys étaient plus bas chez les rats prétraités suggérant que des tissus ayant de faibles concentrations en GSH sont plus vulnérables à la MC-LR et que la GSH est un élément essentiel à la détoxification de la MC-LR *in vivo*. Ces observations ont été confirmées dans une deuxième étude identique réalisée par les mêmes auteurs (Guo *et al.*, 2015 ; Chen *et al.*, 2016a). Une représentation schématique de la détoxification de la MC-LR a été proposée par Guo *et al.* (2015) (Figure 2).

Chez le porc, une injection iv de dihydroMC-LR radiomarquée ($75 \mu\text{g.kg}^{-1}$) ou une exposition de l'anse iléale à la même dose ont toutes deux montré une excrétion par voie biliaire dans les 30 premières minutes, et un passage par la veine porte (effet de premier passage hépatique) (Stotts *et al.*, 1997a et b). Les deux voies d'administration ont permis de montrer une élimination biphasique rapide. A des doses plus élevées, l'élimination dans le sang est ralentie, probablement en raison de la toxicité hépatique et du choc circulatoire observés.

Lowe *et al.* (2012) ont administré par voie ip une dose de $55 \mu\text{g.kg}^{-1}$ pc à des rats Wistar et ont pu montrer une élimination partielle de la MC-LR dans l'urine et les fécès dans les 24h suivant l'exposition. La présence des conjugués de la MC-LR à la GSH et la cystéine dans les urines a aussi été rapportée. De même, lorsque des souris N:NIH-S sont exposées à $25 \mu\text{g MC-LR}\cdot\text{kg}^{-1}$ par voie ip durant une semaine, la présence de la toxine est détectée dans les urines et les matières fécales (Sedan *et al.*, 2015).

3.2 Toxicité aiguë et subaiguë

Les études *in vivo* par voie orale (eau de boisson et gavage) chez les mammifères ont principalement été retenues pour réaliser le profil toxicologique de la microcystine-LR. Certaines études par voie ip et/ou iv ont permis de compléter ce profil et d'apporter plus de poids aux effets observés par voie orale.

3.2.1 Effets aigus et subaigus

3.2.1.1 Données chez l'Homme

Aucune donnée n'est disponible à ce jour.

3.2.1.2 Données chez l'animal

Fitzgeorge *et al.*, (1994) ont exposé des souris CBA et des souris BALBc (sexe et nombre d'animaux non précisés) à la MC-LR (qualifiée de convenablement purifiée) par gavage. Des décès sont rapportés dans les deux heures suivant l'administration. La DL_{50} a été estimée à $3000 \mu\text{g.kg}^{-1}$ et une augmentation du poids du foie (43%) et des reins (5,9%) a été rapportée.

Yoshida *et al.* (1997) ont évalué la toxicité aiguë par voie orale chez des souris BALB/c en leur administrant par gavage une solution saline contenant la MC-LR (purifiée à plus de 95%). Les auteurs ont d'abord utilisé des doses allant de $16,8$ à 20 mg.kg^{-1} , où la mort de deux souris a été rapportée dans les 160 minutes après ingestion. Pour déterminer une DL_{50} , les souris ont reçu des doses de MC-LR de 0, 8, 10 et $12,5 \text{ mg.kg}^{-1}$. Une DL_{50} de 10 mg.kg^{-1} a été établie par les auteurs. Des dommages hépatiques ont été observés chez les animaux exposés à des doses supérieures à 10 mg.kg^{-1} accompagnés de dommages rénaux pour les souris décédées.

Ito *et al.* (1997a) ont comparé les effets aigus de la MC-LR sur le foie et le tractus gastro-intestinal de souris mâles ICR âgées de 5 et 32 semaines. Les animaux ont reçu une unique dose par

gavage de 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de MC-LR. Les auteurs ont observé les effets les plus sévères chez les souris âgées de 32 semaines. Contrairement aux jeunes souris, des changements pathologiques hépatiques ont été observés chez les souris âgées, tels que des saignements, une disparition des hépatocytes et une nécrose de la région centrolobulaire.

Des souris Cr1:CD-1(ICR)BR et des rats Cr1:CD(SD)BR ont été exposés à la MC-LR (pureté non indiquée) par gavage (une dose unique de 500, 1580 ou 5000 $\mu\text{g.kg pc}^{-1}$) et sacrifiés 14 jours après l'administration de la dose. Des DL_{50} de 5000 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{pc}^{-1}$ et $> 5000 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ont été déterminées pour les souris et les rats, respectivement. Des dommages hépatiques plus ou moins sévères ont été observés à toutes les doses d'exposition chez les deux espèces (Fawell *et al.*, 1999).

Une autre étude a permis de comparer les effets aigus par voie orale de la MC-LR chez des souris mâles Swiss albino jeunes (6 semaines) et plus âgées (36 semaines) (Rao *et al.* 2005). Une dose unique de MC-LR (3,5 g.kg^{-1} d'extrait cellulaire de *Microcystis aeruginosa* soit 9,625 mg.kg^{-1} de MC-LR) a été administrée. Les auteurs relèvent alors une mortalité entre 4 et 5 heures après l'administration, avec un temps plus court chez les souris âgées de 36 semaines. Les deux groupes exposés ont montré une augmentation du poids du foie et une fragmentation de l'ADN par rapport aux contrôles, mais aucune différence entre les deux groupes n'a été notée. Cependant, une plus grande augmentation de la déplétion en GSH et de la peroxydation lipidique a été observée chez les souris plus âgées, de même que la concentration de γ -GT sérique.

L'administration d'extraits d'*Aphanizomenon flos-aquae* (produisant environ 20 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de MC-LR) via l'alimentation chez la souris, pendant 64 jours, a permis d'établir une dose maximale sans effet observable (NOAEL), pour la MC-LR, estimée entre 43,3 et 333 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (selon l'estimation de l'ingestion) pour tous les aspects toxicologiques testés (mortalité, poids corporel, poids des organes, histologie) (Schaeffer *et al.*, 1999).

Heinze *et al.* (1999) ont mis en évidence des dommages hépatiques (lésions et poids relatif du foie augmenté de 17%) et une modification de la biochimie sérique permettant de déterminer une dose minimale avec un effet nocif observable (LOAEL) de 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ chez le rat, par voie orale (eau de boisson, 28 jours, MC-LR dont la pureté n'est pas indiquée).

Une LOAEL de 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ est aussi établie après avoir exposé des souris N:NIH-S par gavage à de la MC-LR (50 et 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) issue d'extraits purifiés de *Microcystis aeruginosa* toutes les 48h pendant 1 mois (Sedan *et al.*, 2015). Comme l'exposition a été réalisée tous les 2 jours, les auteurs ont extrapolé une LOAEL de 25 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Les effets associés sont des modifications histologiques dans le foie (vacuolisation, stéatose), une diminution des lymphocytes intra-épithéliaux dans le petit intestin, une augmentation des lipides sanguins, et une modification de certains marqueurs du stress oxydatif (augmentation de la peroxydation des lipides, diminution de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et de la quantité de GSH). L'exposition à une dose de 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ engendre le même type d'effets mais plus marqués.

Des souris mâles ont été exposées à 0,04 et 0,2 $\text{mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ de MC-LR par voie orale pendant 28 jours. Les auteurs ont pu alors définir une LOAEL de 40 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour des effets divers : augmentation du poids du foie, des lymphocytes et des vacuoles lipidiques autour de la veine

centrale hépatique, modification des variables biochimiques hépatiques et sanguines (CT, HDL, LDL, VLDL²), et modification du microbiote intestinal (Zhang *et al.*, 2016).

3.2.2 Irritation et sensibilisation

3.2.2.1 Données chez l'Homme

Aucune donnée n'est disponible à ce jour.

3.2.2.2 Données chez l'animal

Aucune étude sur les effets irritants et sensibilisants de la MC-LR purifiée n'a été recensée à ce jour. Des échantillons d'efflorescences cyanobactériennes provenant de cinq lacs ou étangs différents ont été testés sur des cochons d'Inde et des lapins afin d'évaluer les effets irritants et sensibilisants, respectivement (Torokne *et al.*, 2001). Les concentrations en MC (total de LR, RR et YR) des échantillons prélevés variaient de 0,1 à 2,21 mg.g⁻¹. Pour déterminer la sensibilisation, les cochons d'Inde ont reçu une injection intradermique puis une application locale sur le site de l'injection sept jours plus tard. La sensibilisation a été modérée à sévère chez 30 à 67% des animaux mais aucune corrélation entre l'intensité de la réaction de sensibilisation et la concentration en MC n'a été mise en évidence. Tous les échantillons ont induit une irritation oculaire et cutanée négligeable à légère chez les lapins.

3.3 Toxicité subchronique et chronique

3.3.1 Données chez l'Homme

Aucune donnée n'est disponible à ce jour.

3.3.2 Données chez l'animal

Des souris ICR ayant reçu 80 ou 100 doses de 80 µg.kg⁻¹ pc de MC-LR (pureté non indiquée) par gavage sur une période de 28 semaines ne montrent pas de changement dans le poids moyen du foie, mais des lésions légères au niveau des hépatocytes situés près de la veine centrale hépatique chez la moitié des individus (Ito *et al.*, 1997b).

L'administration par gavage de MC-LR (0, 40, 200 ou 1000 µg.kg⁻¹.j⁻¹, pureté non indiquée) à des souris mâles pendant 13 semaines induit des altérations hépatiques incluant une inflammation chronique, une dégénérescence d'hépatocytes, ainsi qu'un impact biochimique (ie., transaminases sériques élevées, taux de protéines totales sériques diminués) dans le groupe exposé à 1000 µg.kg⁻¹.j⁻¹. Dans le groupe exposé à 200 µg.kg⁻¹.j⁻¹ une légère atteinte hépatique est observée. Dans cette étude, la dose de 40 µg.kg⁻¹.j⁻¹ est considérée comme la NOAEL (Fawell *et al.*, 1999).

² CT : Cholestérol total ; HDL : Lipoprotéines de haute densité ; LDL : Lipoprotéines de basse densité ; VLDL : Lipoprotéines de très basse densité

Une étude a montré que des souris femelles BALB/c âgées de six semaines ayant ingéré pendant 18 mois $20 \mu\text{g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ de MC-LR *via* l'eau de boisson (quantité cumulée ingérée estimée de 35,5 mg par souris) n'ont pas montré de signe de toxicité (survie, poids corporel, consommation d'aliments, histopathologie du foie) ou d'accumulation de MC-LR dans l'organisme après 18 mois. Il est néanmoins rapporté une hausse importante des taux de cholestérol chez 22% des souris traitées au 18^{ème} mois. En l'absence d'autres effets liés au traitement, les auteurs n'ont pas jugé ces effets significatifs sur le plan toxicologique (Ueno *et al.*, 1999).

Zhang *et al.* (2010) ont exposé des souris C57Bl/6 mâles à des concentrations de 0,1,40 ou $80 \mu\text{g.L}^{-1}$ (soit 0 ; 0,2 ; 8 et $16 \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ selon les auteurs) de MC-LR (pureté $\geq 95 \%$) *via* l'eau de boisson durant 180 jours. Les auteurs ont pu observer une diminution importante du poids corporel et une augmentation du poids relatif du foie aux concentrations supérieures à $40 \mu\text{g.L}^{-1}$ (données non fournies). À ces mêmes concentrations, il est également rapporté une infiltration de lymphocytes et une infiltration graisseuse ainsi qu'une augmentation de l'expression de la métalloprotéinase matricielle 9 (MMP9) a été observée. Les mêmes auteurs ont réalisé cette étude sur 270 jours (Zhang *et al.*, 2012). Ils observent alors à partir de $8 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ une diminution significative du poids corporel et une augmentation relative du poids du foie, une histopathologie modérée avec infiltration de lymphocytes, une augmentation de l'expression des protéines métalloprotéinase et de la phosphorylation de protéines kinase. Cependant, les niveaux d'effets sont difficilement quantifiables dans ces deux études qui ne présentent pas l'intégralité des données.

L'ingestion chronique de MC-LR purifiée *via* l'eau de boisson (concentrations de 1, 5, 10, 20 ou $40 \mu\text{g.L}^{-1}$) par des souris pendant 12 mois entraîne une production d'espèces radicalaires de l'oxygène dans les hépatocytes (à $10 \mu\text{g.L}^{-1}$), une diminution de l'intégrité des ADN mitochondriaux (ADNmt) et nucléaires et de l'amplification des ADNmt (à $20 \mu\text{g.L}^{-1}$), ainsi qu'une variation de l'expression des gènes mitochondriaux et nucléaires liés à la réplication de l'ADNmt avec une dérégulation du fonctionnement des mitochondries et des cellules hépatiques pour toutes les concentrations étudiées (Li *et al.*, 2015b).

Une exposition similaire (même modèle, mêmes concentrations et temps d'exposition) a permis de définir une NOAEL de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ainsi qu'une LOAEL de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ pour des effets histologiques et métaboliques dans les poumons (augmentation de l'épaisseur du septum alvéolaire et des zones de collapsus, modification de l'expression des gènes mitochondriaux dans les cellules pulmonaires, modification des niveaux de cytokines inflammatoires) (Li *et al.*, 2016).

Des valeurs de NOAEL et de LOAEL de 1 et $10 \mu\text{g.L}^{-1}$, concernant des effets hépatiques (infiltration de lymphocytes et stéatose, augmentation du poids relatif du foie, modification de l'expression enzymatique) ou pulmonaires (collapsus et épaississement des septa alvéolaires, rupture de l'intégrité de la jonction cellulaire), ont été respectivement rapportées chez des souris exposées par voie orale pendant 6 mois à de la MC-LR purifiée à des concentrations de 1, 10 et $40 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Wang *et al.*, 2016)

Une LOAEL de $40 \mu\text{g.kg}^{-1}$ est rapportée par He *et al.* (2017) chez des souris mâles gavées toutes les 48h pendant 90 jours à des doses de MC-LR allant de 40 à $200 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Les effets observés

sont des augmentations des concentrations en bilirubine et albumine, une modification de l'expression de 57 protéines hépatiques (associées au métabolisme lipidique, à l'immunité et la protéolyse), une modification du profil métabolique sérique et hépatique, une augmentation du contenu lipidique et des effets histopathologiques hépatiques (infiltrats inflammatoires, hypertrophie des hépatocytes, apoptose, dommages ultra-structuraux), ainsi qu'une augmentation des concentrations de cytokines pro-inflammatoires TNF- α .

3.4 Neurotoxicité

Après une injection intra-hippocampique de 1 ou 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR (pureté $\geq 98\%$), Li *et al.* (2012b) ont observé une altération de la mémoire, évaluée par le test du labyrinthe de Morris chez des rats mâles. Les animaux exposés ont montré une augmentation de la latence à retrouver la plateforme quelle que soit la dose. Chez les rats exposés à 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$, une analyse histologique du cerveau a permis d'observer des dommages dans la région CA1 de l'hippocampe, accompagnés d'une diminution de la densité cellulaire mais pas du volume. Les deux concentrations d'exposition ont entraîné une augmentation du niveau de malondialdéhyde (MDA) et l'activité des catalases dans cette même région. Une augmentation de l'activité de la SOD et de la GSH peroxydase est observée après exposition à 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

L'étude de la neurotoxicité de la MC-LR a été menée *in vivo* sur des rats par des injections intra-hippocampique (1 et 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Les fonctions cognitives (apprentissage et mémoire) se sont révélées fortement altérées, par des tests comportementaux (Li *et al.*, 2014a). De plus, des lésions histologiques et des dommages oxydatifs ont été observés au niveau de l'hippocampe.

Une étude des fonctions cognitives (apprentissage et mémoire) a été réalisée chez des rats Sprague Dawley âgés de 28 jours après une exposition par gavage à la MC-LR (pure à $\geq 95\%$) tous les 2 jours durant 8 semaines (à 0,2, 1 ou 5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Un effet dose-dépendant (allongement du temps pour trouver la plateforme) est observé au 3^{ème} jour. Aucun effet n'a été observé sur la mémoire à long terme et la mémoire de travail. L'analyse histologique de l'hippocampe des animaux montre que sur 3 marqueurs, à la plus forte dose, une différence significative par rapport aux témoins est mise en évidence sur le nombre d'astrocytes marqués et le nombre de neurones marqués. Les auteurs concluent à des altérations du comportement d'apprentissage et à une neuroinflammation dans l'hippocampe (Li *et al.*, 2014b).

Li *et al.* (2015c) ont réalisé une étude de neurotoxicité développementale chez le rat. La MC-LR a été administrée par gavage à des femelles âgées de 28 jours pendant 8 semaines (doses 1, 5 ou 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$) avant gestation. Par conséquent, les portées n'ont pas été exposées directement. Les auteurs n'ont pas observé d'altérations du développement neuromoteur des jeunes à l'exception d'un test (le cliff avoidance³). Chez les mâles, une diminution de la baisse de

³ Cliff Avoidance : Ce test permet d'évaluer la réaction d'évitement de l'animal par rapport au vide. Ce réflexe met en jeu la force musculaire et la coordination des membres antérieurs et postérieurs du rongeur.

performance lors du test « Labyrinthe de Morris⁴ » a été observée dès la plus faible dose. Le même effet est observé chez les femelles aux deux plus fortes doses. Une toxicité pro-inflammatoire au niveau hippocampique a été observée à la plus forte dose (marqueurs de peroxydation lipidique et stress oxydant). Les auteurs concluent que l'exposition progestationnelle des mères conduit à une neurotoxicité développementale à court et moyen terme.

3.5 Effets sur la reproduction et le développement

3.5.1 Données chez l'Homme

Aucune donnée n'est disponible à ce jour.

3.5.2 Données chez l'animal

Une étude de toxicité développementale a été conduite par Fawell *et al.* (1999), dans laquelle des souris gestantes ont été exposées à la MC-LR (pureté non indiquée) par gavage à des doses de 0, 200, 600 ou 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ aux jours 6 à 15 de gestation. Les souris ont été sacrifiées au 18^{ème} jour de gestation. Sur 26 souris exposées à 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$, sept mères gestantes sont mortes et deux autres ont été sacrifiées pour état moribond. L'autopsie de ces animaux a révélé un foie altéré. Aucune modification apparente n'a été observée chez les souris survivantes. Les fœtus des mères exposées à la plus forte dose ont montré un retard dans l'ossification du squelette ainsi qu'un poids corporel inférieur à celui des animaux témoins.

Dans une étude réalisée par Chen *et al.* (2011), des souris mâles ont été exposées à la MC-LR (0, 1, 3,2 ou 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) *via* l'eau de boisson durant trois ou six mois. Aucun groupe n'a présenté de signes cliniques de toxicité ni de modification du poids corporel ou du poids des testicules. Une diminution significative du nombre de spermatozoïdes et de leur mobilité à partir de 3,2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ est observée après 3 ou 6 mois d'exposition à la MC-LR. Ces effets sont accompagnés d'une augmentation significative d'anomalies spermatiques à partir de 3,2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ lors d'une exposition d'une durée de 6 mois. Après 3 mois d'exposition, le taux de testostérone diminue de façon significative à la plus forte dose (10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Après 6 mois d'exposition, on observe une diminution significative du taux de testostérone par destruction des cellules de Leydig et une augmentation dose-dépendante du taux de LH à partir de 3,2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, ainsi qu'une augmentation du taux de FSH à 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, traduisant un hypogonadisme compensé. Une désorganisation de l'épithélium des tubules séminifère est notée par les auteurs chez les souris exposées à 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pendant 3 mois, tandis qu'une atrophie testiculaire est également observée après 6 mois d'exposition à 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Cette atrophie est associée à un élargissement de la lumière des tubules séminifères, un amincissement de l'épithélium spermatogène, ainsi qu'une destruction des cellules de Leydig, de Sertoli et des spermatozoïdes matures. Le nombre de cellules apoptotiques augmente significativement après trois mois à 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, et après six mois à partir de 3.2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Une NOAEL de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ est établie dans cette étude.

⁴ Labyrinthe de Morris : Dispositif aquatique circulaire très utilisé en neurosciences comportementales pour évaluer la mémoire du rongeur.

Des souris femelles BALB/c ont été exposées à la MC-LR (1, 10 et 40 $\mu\text{g.L}^{-1}$, purifiée à plus de 95%) par l'eau de boisson pendant 3 ou 6 mois (Wu *et al.*, 2015). Après 3 mois d'exposition, les auteurs ont pu observer une atrésie des follicules à 40 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Cette atrésie survient dans tous les groupes exposés 6 mois et est accompagnée d'une diminution du nombre de follicules primordiaux, primaires, secondaires et antraux. Des anomalies du cycle oestral sont observées à 3 et 6 mois lors d'une exposition à 40 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Une augmentation significative du taux de mortalité à la naissance est relevée par les auteurs dans les groupes exposés à 40 $\mu\text{g.L}^{-1}$ durant 3 mois, et dans les groupes exposés à 10 et 40 $\mu\text{g.L}^{-1}$ durant 6 mois. Ces effets ont permis de définir une NOAEL de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (à 3 mois) ou 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (à 6 mois), et une LOAEL de 40 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (à 3 mois) et de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (à 6 mois).

Chez la souris mâle BALB/c, l'administration par voie orale de MC-LR *via* l'eau de boisson (1 ; 10 ; 20 ou 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$), pendant 90 jours, provoque une fibrose accrue du tissu testiculaire, une diminution significative et dose dépendante (à partir de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$) du nombre de spermatozoïdes ainsi qu'une augmentation du nombre d'anomalies spermatiques (5 morphologies anormales chez les souris exposées à 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$) (Chen *et al.*, 2016b, 2017).

Des souris gestantes BALB/c ont été exposées à la MC-LR du 12^{ème} jour de la période embryonnaire jusqu'au 21^{ème} jour post-natal à 1, 10 ou 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ par voie orale (eau de boisson *ad libitum*). Au 30^{ème} jour après la naissance, on constate une diminution significative de la taille des animaux exposés à 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ par rapport aux témoins, de même que l'index PHI des groupes exposés à 10 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$. En revanche, aucune différence entre les groupes n'est observée concernant la distance ano-génitale. Après 90 jours, il est constaté une diminution de ces trois paramètres par rapport aux contrôles pour toutes les doses d'exposition. Les auteurs ont montré que la MC-LR pouvait interférer dans le développement de la prostate des souris mâles de la descendance, notamment *via* l'observation d'une nécrose prostatique, d'une hyperplasie, d'une inflammation et de fibrose. Ce phénomène pourrait être expliqué par la perturbation de la conversion des androgènes en oestrogènes observée au cours de l'étude (Zhang *et al.*, 2017a).

Les mêmes auteurs ont exposé des souris gestantes BALB/c du 12^{ème} jour de la période embryonnaire jusqu'au 21^{ème} jour post-natal de 1 à 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ par voie orale (eau de boisson *ad libitum*) et ont pu constater une diminution du poids corporel, de l'indice testiculaire et de la prolifération cellulaire dans les testicules des descendants, ainsi qu'une augmentation de l'apoptose cellulaire et des dommages dans la structure des tissus testiculaires (Zhang *et al.*, 2017b). Ces effets seraient potentiellement médiés par une modification de l'expression des ARNpi.

Bien que la voie d'exposition par injection ip ne soit pas considérée comme pertinente pour évaluer les risques de toxicité liés à une exposition orale, certaines études réalisées sur des souris et autres espèces de rongeurs nous permettent de renforcer les éléments de preuve sur le caractère reprotoxique masculin et féminin de la microcystine-LR.

L'exposition à la MC-LR chez le lapin, le rat ou la souris par voie ip entraîne des modifications histologiques sévères ayant un impact sur la qualité spermatique en altérant les tubes séminifères, les cellules de Leydig, les cellules germinales et les cellules de Sertoli. De plus, chez le rat (28

jours d'exposition) et chez la souris mâle (6 mois d'exposition) ou sa descendance (souris gestante exposée du 12^{ème} jour de gestation au 21^{ème} jour postnatal), on constate un hypogonadisme non compensé (diminution de la testostérone sérique sans augmentation de la LH ou FSH circulante). Des changements dans les hormones lutéinisantes circulantes, les hormones folliculostimulantes et les niveaux de testostérone, ainsi que dans l'expression des gènes *Lhβ*, *Fshβ* et *GnRH* ont aussi pu être observés (Bu *et al.*, 2006 ; Ding *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008,2009,2011a ; Wang *et al.*, 2012 ; Chen *et al.*, 2013a ; Wang *et al.*,2013b ; Zhou *et al.*, 2013 ; Wu *et al.* 2014 ; Meng *et al.* 2016).

Les doses nécessaires pour observer un effet toxique sont d'autant plus faibles que l'exposition est de longue durée. Il est à noter que les effets sur l'appareil reproducteur féminin sont encore mal caractérisés.

3.6 Génotoxicité et mutagénéité

La mutagenèse et la génotoxicité de la MC-LR ou d'extraits de cyanobactéries microcystiques (MCE) ont été évaluées au travers une multiplicité de systèmes d'essai présentant différents niveaux d'organisation (bactéries, cellules, animaux), mesurant différents paramètres biologiques ou « endpoints » (altérations primaires de l'ADN, mutations géniques et chromosomiques) selon des conditions expérimentales mises en œuvre très hétérogènes (méthode, niveau et temps d'exposition).

Sur la base de l'ensemble des résultats de tests *in vitro* d'altérations primaires de l'ADN, lorsque des effets considérés comme significatifs par leurs auteurs ont été notés, il n'est pas possible de les attribuer à une génotoxicité intrinsèque de la MC-LR. La démonstration d'un mode d'action génotoxique de type oxydatif direct n'est pas probante.

Concernant l'induction de mutations chromosomiques, cinq études sur différents modèles cellulaires, différentes conditions opératoires, avec des temps de traitement parfois très longs (plus de 24 heures) ont été évaluées, et des résultats considérés comme significatifs ont été obtenus. Néanmoins, ces résultats ont été obtenus sur différents extraits de cyanobactéries dont les teneurs en MC-LR sont parfois inconnues (Abramsson-Zetterberg *et al.*, 2010). Quelques fois, les résultats étaient réalisés sur un système d'essai basé sur des cellules génétiquement modifiées non standardisé et très peu décrit dans la littérature, réalisé dans des conditions expérimentales très limitées (une seule dose) et ayant mené à un résultat statistiquement significatif exclusivement après un temps très long d'exposition de 30 jours qui pourrait conduire à des phénomènes secondaires (Huang *et al.*, 2009 ; et Wang *et al.*, 2015),

En revanche, aucune induction du nombre de cellules micronucléées n'a été observée dans les lymphocytes humains binucléés traités jusqu'à 10 µg MC-LR.mL⁻¹ (Zegura *et al.*., 2011), mais des résultats significatifs ont été notés vis-à-vis de cellules humaines HepG2 traités pendant 24h à 5 et 20 µM (soit d'environ 5 et 20 µg.mL⁻¹) sans qu'aucun mode d'action éventuel ne puisse être proposé (Dias *et al.*, 2014). En outre, l'occurrence d'un mécanisme aneugène ne peut pas être affirmée.

Concernant l'induction de mutations géniques, au cours de trois tests d'Ames (système bactérien) utilisant différentes conditions expérimentales, la MC-LR pure ne s'est pas révélée mutagène avec ou sans activation métabolique vis-à-vis des souches classiquement requises (à l'exception de la souche de *Salmonella typhimurium* TA102 mais qui a été substituée par les souches d'*Escherichia Coli* WP2 *uvrA* et WP2 [pKM101]), permettant de mettre en évidence des événements mutationnels de type décalage du cadre de lecture et substitution de paires de bases. Les seules réponses « positives » ont été observées sur des extraits de cyanobactéries microcystiques (Ding *et al.*, 1999 ; Sieroslawska *et al.*, 2013) confirmant la présence de substance(s) mutagène(s).

Le seul test de mutations géniques disponible sur cellules de mammifère (Wang *et al.*, 2015) correspond à un système d'essai non standardisé basé sur des cellules génétiquement modifiées, dont les données dans la littérature sont restreintes compliquant l'évaluation de ses performances en termes de sensibilité et de spécificité et réalisé dans des conditions expérimentales très limitées (une seule dose). Les résultats sont majoritairement négatifs avec une augmentation statistiquement significative de la fréquence de mutation observée exclusivement après un temps très long d'exposition de 30 jours qui pourrait conduire à des phénomènes secondaires (tels que des processus inflammatoires compatibles avec l'implication de la NOS) interférant avec ce type de détection.

Globalement, ces résultats permettent de conclure que la MC-LR n'est pas mutagène *in vitro* sur un système bactérien alors que les réponses mutagènes observées pour des extraits de cyanobactéries microcystiques sont dues à la présence d'autre(s) substance(s) mutagène(s). L'induction de mutations géniques est le paramètre biologique qui est sans doute le mieux renseigné qualitativement.

Le test des comètes *in vivo* a également été réalisé sur plusieurs éléments d'essai (MC, MCE), divers organes cibles, différentes espèces. Des augmentations statistiquement significatives de la fragmentation de l'ADN *in vivo* ont été rapportées dans 4 études dont 2 qui ont investigué des MCE, on ne peut donc pas exclure que la réponse génotoxique observée soit due à d'autre(s) substance(s) que la MC-LR.

Pour les essais sur la MC-LR pure, ces effets significatifs pourraient être directement liés aux conditions expérimentales utilisées menant à des effets secondaires non intrinsèques à la MC-LR tels que :

- l'interférence avec la méthode même d'isolement en utilisant la méthode de broyage des cellules utilisée par Sasaki *et al.*, (1998),
- l'intégration dans le comptage principal des cellules fortement endommagées qui doivent être comptabilisées indépendamment de la lecture principale. Ces cellules doivent en effet être exclues du comptage car elles peuvent être liées à des phénomènes cytotoxiques (apoptose, nécrose) et non pas à la génotoxicité,
- l'utilisation de l'Olive Tail Moment (OTM) comme paramètre de quantification de la fragmentation de l'ADN connu pour surestimer la réelle fragmentation,

- le non suivi des critères d'interprétation définis par la ligne directrice de l'OCDE No. 489, permettant d'évaluer la significativité biologique de ces effets,
- l'augmentation transitoire de la fragmentation de l'ADN observée par Dias *et al.*, (2014) qui ne peut pas être considérée comme biologiquement significative.

Par ailleurs, l'étude de Gaudin *et al.* (2008) a également mis en évidence des effets statistiquement significatifs sur la fragmentation de l'ADN mais les niveaux de fragmentation sont considérés comme très faibles et en absence de données historiques, ceux-ci ne peuvent pas être considérés comme biologiquement significatifs.

Sur l'ensemble des résultats de tests des comètes *in vivo*, tests d'altération primaire de l'ADN, il ne peut pas être conclu que la MC-LR soit génotoxique *in vivo*, ni par voie orale, ni par voie intrapéritonéale.

On considère que les données des tests mesurant l'induction d'anomalies chromosomiques stables, en particulier *in vivo* dans les systèmes de mammifères, sont à considérer pour déterminer un effet génotoxique (Brusick *et al.*, 2016). Cinq tests du micronoyau *in vivo* sont disponibles.

L'étude de Zhang *et al.* (2011) réalisée sur un mélange de 3 MC [MC-RR + MC-LR + MC-YR] a mené à des augmentations statistiquement significatives de l'induction de micronoyaux mais l'analyse de teneur en MC totales (1,41 mg.g⁻¹) confirme la présence de nombreuses autres substances qui peuvent être à l'origine des effets génotoxiques observés comme cela a été clairement constaté dans plusieurs expérimentations *in vitro*. On ne peut donc pas exclure que la réponse génotoxique observée pour cet extrait est due à d'autre(s) substance(s) que la MC-LR et autres MC.

Aucune augmentation de la fréquence des érythrocytes polychromatiques micronucléés n'a été retrouvée au niveau du sang périphérique de souris mâles CBA exposées par voie intrapéritonéale aux doses allant de 10 à 55 µg MC-LR.kg⁻¹ (Abramsson-Zetterberg *et al.*, 2010).

La MC-LR a induit une augmentation significative de la fréquence de réticulocytes micronucléés après un traitement unique de souris mâles à la seule dose de MC-LR de 37,5 µg.kg pc⁻¹ par voie ip (Dias *et al.*, 2014). Or, dans cette même étude, aucune augmentation biologiquement significative de la fragmentation de l'ADN n'a été mise en évidence dans le test des comètes. L'hypothèse d'un mode d'action aneugène de la MC-LR a été avancée. Néanmoins, les conditions expérimentales étant trop restreintes (1 seule dose testée) et la probabilité d'un mécanisme d'inhibition des protéines phosphatases par la MC-LR dans ces conditions opératoires totalement hypothétiques, le niveau de preuve est donc insuffisant pour confirmer un mode d'action génotoxique de type aneugène, même si cette hypothèse ne peut pas *a priori* être totalement écartée.

Enfin, les résultats de la publication de Dong *et al.*, (2008) ne peuvent être retenus. En effet, d'une part cette évaluation sur spermatoocytes ne fait référence à aucun essai réglementaire de génotoxicité sur cellules germinales. Par ailleurs, cette étude ne donne que très peu de détails protocolaires et le résultat des fréquences de micronoyaux n'est même pas présenté. De plus, il

faut également souligner qu'à ce jour, aucune publication n'a mis en évidence de substances génotoxiques exclusivement sur cellules germinales.

L'ensemble des résultats de tests d'induction d'aberrations chromosomiques *in vivo*, ne permet pas de conclure que la MC-LR est génotoxique *in vivo*, ni de mettre en avant un quelconque mode d'action.

Aucune étude évaluant l'induction de mutations géniques *in vivo* par la MC-LR n'est publiée.

Enfin, l'hypothèse d'un mode d'action oxydant/nitrosant (direct et/ou indirect) de la MC-LR conduisant à des effets génotoxiques a été proposée. Quand elle a été investiguée, les résultats ne permettent pas d'affirmer que l'induction d'une oxydation initiale directe intrinsèque à la MC-LR existe et lorsqu'elle a été retrouvée, elle semble même plutôt due à des phénomènes interférant (e.g., peroxydation lipidique) pouvant être à l'origine d'une oxydation secondaire. Certains auteurs ont aussi démontré que des extraits MCE augmentaient les taux de malondialdéhyde *in vivo* (Li *et al.*, 2011b).

Sur la base d'un examen critique de l'ensemble des données sur la génotoxicité de la microcystine-LR associé à une évaluation par une approche de type « Poids de la preuve », le CES arrive à la conclusion qu'il n'est pas possible de statuer sur le caractère génotoxique de la microcystine-LR.

3.7 Cancérogénicité

Les données de cancérogenèse concernant l'exposition à la MC-LR par voie orale sont limitées. Le CIRC (Centre international de recherche sur le cancer) a classé la MC-LR comme possiblement cancérogène pour l'Homme (Groupe 2B) sur la base d'études *in vivo* par voie ip (CIRC, 2010).

Chez la souris, l'administration orale de MC-LR (80 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) répétée 100 fois dans une période de 28 semaines ne provoque pas de formation de nodule au niveau du foie (Ito *et al.*, 1997).

Dans l'étude de Labine et Minuk (2014), aucune tumeur hépatique n'a été mise en évidence chez des souris ayant reçu 1 mg.L^{-1} de MC-LR *via* l'eau de boisson pendant 28 semaines.

L'administration de MC-LR *via* l'eau de boisson (1, 5, 10, 20, 40, et 80 $\mu\text{g.L}^{-1}$) à des souris pendant 3, 6, 9, et 12 mois engendre, pour les concentrations les plus élevées (40 et 80 $\mu\text{g.L}^{-1}$) et après 9 et 12 mois, la présence de nodules tumoraux hépatiques et une augmentation du nombre de cellules atypiques (Xu *et al.*, 2018).

Des études ont montré un effet promoteur de tumeur *in vivo* par voie ip (Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992 ; Sekijima *et al.*, 1999). Les données issues d'administration par voie ip ne sont pas considérées dans ce rapport mais il est intéressant de noter qu'il semble exister une différence d'intensité d'effets entre les deux voies d'administration. En effet, chez la souris, l'administration subchronique par voie ip de MC-LR (20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) provoque l'apparition de nodules hépatiques (Ohta *et al.*, 1994) contrairement à l'administration d'une dose plus forte (80 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) par voie orale (Xu *et al.*, 2018). Enfin, il a été récemment montré que la MC-LR induisait *in vivo* l'hyperplasie de la prostate dans un modèle murin, sans que cela ne soit associé à l'apparition de tumeurs prostatiques (Pan *et al.*, 2018).

3.8 Mécanismes d'action

Des études mécanistiques ont été réalisées, incluant des travaux *in vivo*, *in situ* sur des organes isolés et perfusés et *in vitro*, afin de caractériser la toxicologie de la MC-LR.

- **Inhibition des protéines phosphatases**

Le mode d'action principal de la toxicité induite par la MC-LR implique l'inhibition des protéines phosphatase sérine/thréonine (PP) et notamment les PP1 et PP2A (Barford *et al.* 1998). Les protéines phosphatases régulent une suite de phénomènes cellulaires chez les mammifères tels que la prolifération et division cellulaire, la transduction de signal ou l'expression de gènes (Rossini, 2014).

De nombreuses méthodes ont été utilisées afin d'étudier l'interaction moléculaire entre les microcystines et les protéines phosphatase (Runnegar *et al.*, 1995; MacKintosh *et al.*, 1995; Goldberg *et al.*, 1995 ; Craig *et al.*, 1996 ; Maynes *et al.*, 2004 et 2006, Campos et Vasconcelos, 2010). Des études ont montré l'implication des acides aminés Adda, leucine, Mdha et glutamate dans ces liaisons (Namikoshi *et al.*, 1993 ; Rinehart *et al.*, 1994 ; Herfindal et Selheim, 2006). Il a été montré que la liaison covalente avec la MC a lieu au niveau de la cystéine 273 de la PP1 et de la cystéine 269 de la PP2A (Harada *et al.*, 1990 ; Goldberg *et al.*, 1995 ; MacKintosh *et al.*, 1995 ; Craig *et al.*, 1996 ; Maynes *et al.*, 2004).

L'inhibition de la PP2A par les MC-LR, menant à une hyperphosphorylation des protéines, est à l'origine de nombreux mécanismes de toxicité. Liu et Sun (2015) ont rapporté dans une revue le rôle des protéines associées à la PP2A dans les voies de signalisation impliquées dans la toxicité de la MC-LR.

- **Modification du cytosquelette**

Une revue sur la perturbation du cytosquelette induite par la MC-LR a été récemment réalisée par Zhou *et al.* (2015).

L'altération des microtubules par l'inhibition des PP2A induite par la MC-LR, est observée dans les cellules d'origine humaine à partir de 1 μM MC-LR de façon dose dépendante (Sun *et al.*, 2011, 2014). Il a été montré que la toxine affectait l'homéostasie de nombreux gènes du cytosquelette dans le foie, le rein et la rate chez le rat Wistar mâle traité à 80 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Hao *et al.*, 2010).

La MC-LR agit aussi sur les protéines appartenant à la famille des MAP-K (Mitogen-Activated protéines kinases), amenant à une hyperphosphorylation de différents types de protéines associées aux microfilaments tels que Tau (Tubuline Associated Unit), VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) et HSP27 (Heat Shock Protein 27) (Zeng *et al.*, 2015 ; Sun *et al.*, 2015). L'état de phosphorylation de ces protéines influence leur capacité à stabiliser le cytosquelette dans la cellule. En plus d'agir sur la phosphorylation de ces protéines, la MC-LR agit également sur leur distribution et leur liaison sur le cytosquelette (Sun *et al.*, 2015).

Lorsqu'elle se lie à la sous-unité catalytique C de la PP2A, la protéine $\alpha 4$ forme un complexe à faible activité catalytique, qui permet de servir de réserve en cas de besoin lors d'un stress cellulaire. La MC-LR cible la dissociation de ce complexe, ce qui expliquerait la compensation de la réduction de l'activité de la PP2A observée dans les cellules exposées à une faible concentration de MC-LR (Liu et Sun., 2015). L'inhibition de la PP2A pourrait donc avoir lieu lorsque la réserve de complexe α /PP2A/C est épuisée. En effet, des cellules HEK293 surexprimant la protéine $\alpha 4$ sont moins sensibles à l'altération du cytosquelette médiée par l'inhibition de la PP2A après exposition à la MC-LR (Huang *et al.*, 2016). De plus, la protéine $\alpha 4$ est essentielle à la phosphorylation de protéines associées au cytosquelette tels que HSP27 et VASP.

- **Induction du stress oxydant**

Lors d'une exposition à la MC-LR, la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) augmente et est parfois accompagnée d'une déplétion en GSH, traduisant ainsi un phénomène de stress oxydant pouvant également conduire à une mort apoptotique des cellules *via* la libération de certains facteurs apoptotiques (Campos et Vasconcelos., 2010).

In vivo, des changements d'expression d'ARNm et de protéines de stress du réticulum endoplasmique sont observés après une exposition répétée de 7 jours à la MC-LR chez la souris par voie intrapéritonéale (Qin *et al.*, 2015).

Une récente publication a mis en évidence chez la souris femelle C57BL/6 exposée à la MC-LR la capacité de la toxine à induire dans les ovaires une apoptose des cellules, et un stress cellulaire *via* la stimulation de la production d'ERO et de MDA mais aussi une déplétion des capacités antioxydantes cellulaires (Liu *et al.*, 2018).

Dans des hépatocytes primaires, l'induction d'ERO a été observée, accompagnée d'une inhibition de la PP2A (Zegura *et al.*, 2004).

Bien que les mécanismes liés à la production d'ERO induite par la MC-LR ne sont pas encore bien caractérisés, l'implication d'une dysfonction mitochondriale (chute du potentiel membranaire et transition de la perméabilité) et l'activation de calpaïne et de la protéine kinase II Ca^{2+} /calmoduline-dépendante (CamKII) ont été suggérées (Ding et Nam Ong., 2003).

In vitro, l'exposition à la MC-LR a montré un effet dose et temps dépendant de la production d'ERO, de l'activation de la p38-MAPK et de la phosphorylation de Tau (Meng *et al.*, 2015).

L'injection par voie ip de 0,25 et 0,5 $\mu\text{g MC-LR.kg pc}^{-1}$ chez le rat a entraîné une altération temps-dépendant de niveau de GSH dans le foie, des changements significatifs de taux d'enzymes antioxydantes (GSH réductase et peroxydase), l'activation de NF- κ B et l'expression de p53, Bax et Bcl-2 (Chen *et al.*, 2016b). Le prétraitement avec des antioxydants, *in vivo* et *in vitro*, a significativement diminué l'apoptose induite par la MC-LR traduisant la suppression du stress oxydant et l'augmentation de la fonction mitochondriale (Meng *et al.*, 2015 ; Xue *et al.*, 2015).

- **Induction de l'apoptose**

La phosphorylation observée de protéines telles que p53, Bcl-2 et Bad, du cytochrome c et des caspases pourraient expliquer l'apoptose induite lors d'une exposition à la MC-LR (Wang *et al.*, 2013b; Liu *et al.*, 2016a et b). De plus, la CamKII est nécessaire lors de l'apoptose induite par la MC-LR : l'utilisation d'inhibiteur de CamKII limite la phosphorylation des protéines liées à l'apoptose (Liu et Sun., 2015). L'augmentation de l'expression de la protéine p53 a été montrée *in vitro* dans des cellules HepG2 apoptotiques, des hépatocytes en culture et dans le tissu hépatique de rats après exposition à la MC-LR (Campos et Vasconcelos 2010).

Après exposition à la MC-LR, une augmentation des protéines Bax et Bid, proapoptotiques, a été observée ainsi qu'une diminution de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Fu *et al.*, 2005 ; Weng *et al.*, 2007 ; Xing *et al.*, 2008 ; Takumi *et al.*, 2010 ; Huang *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2011a).

Mode d'action sur les organes cibles

Dans le foie, ces mécanismes mènent à une toxicité centrolobulaire avec des zones hémorragiques hépatiques lors d'exposition aiguës à de fortes doses de MC-LR. Lors d'une exposition répétée, à plus faible dose (< 20 µg.kg pc⁻¹; Gehringer, 2004), l'inhibition des phosphatases entraîne une prolifération cellulaire et une hypertrophie hépatique ainsi qu'une activité promotrice de tumeur (Svirčev *et al.*, 2010).

Ces dernières années, de nombreuses publications ont pu mettre en évidence, *in vivo* comme *in vitro*, une forte association entre une toxicité de la reproduction et une exposition à la MC-LR, à de multiples doses, par différentes voies et sur plusieurs espèces (cf. § 3.5 ; Chen *et al.*, 2016c). Il existe peu d'études mécanistiques sur la toxicité sur l'appareil reproducteur femelle.

Chez le mâle, il a été montré *in vivo* la présence de la MC-LR au sein du testicule (cellules de Sertoli et spermatogonies) après exposition par voie ip, suggérant la capacité de la toxine à traverser la barrière hémato-testiculaire (Wang *et al.*, 2008 et 2013a). Les mêmes auteurs ont démontré la formation d'adduits à la PP2A dans les testicules.

L'inhibition de l'activité de cette protéine phosphatase observée entraînerait alors une perturbation des voies de signalisation PI3K-AKT, MAPK/ERK mais aussi MAPK/JNK, et serait responsable de l'augmentation du taux des protéines MMP-8 et Snail (Zhang *et al.*, 2017a ; Chen *et al.*, 2018 ; Zhou *et al.*, 2018), capables de dégrader ou réprimer, respectivement, les protéines des jonctions serrées de la barrière hémato-testiculaire (Zhou *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016b et 2017). Ces modifications cellulaires pourraient expliquer en partie les dommages histologiques observés au niveau des tubules séminifères des testicules (dissémination et pertes des cellules, relâchement du tissu testiculaire) et les conséquences sur la spermatogénèse qui en découlent.

La dépopulation des cellules de Sertoli, de Leydig et de cellules spermatogéniques observée dans les études de reprotoxicité pourrait aussi s'expliquer par l'implication de nombreux facteurs apoptiques déclenchés lors de l'exposition à la MC-LR. La toxine entraînerait en effet une augmentation du taux des protéines proapoptotiques p53, Bax, du cytochrome c, des caspases 3, 8 et 9 mais aussi du système Fas/FasL (Xiong *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2012c ; Chen *et al.*, 2013b ; Wang *et al.*, 2013b ; Zhou *et al.*, 2013). Des mécanismes inflammatoires et de type oxydatif ont également été mis en évidence lors d'une exposition à la MC-LR, pouvant par conséquent être

responsables de la mort des cellules (Xiong *et al.*, 2010 ; Saad *et al.*, 2012 ; Chen *et al.*, 2013a et 2017).

Enfin, les perturbations fonctionnelles du système reproducteur mâle induites par la MC pourraient aussi s'expliquer par une modification du système endocrinien. En effet, la MC-LR est capable de perturber les taux de testostérone, de LH et FSH mais aussi de GnRH au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Chen *et al.*, 2011 ; Wang *et al.*, 2012 ; Xiong *et al.*, 2014). La MC-LR pourrait donc avoir un effet direct cytotoxique sur le testicule mais aussi indirect *via* l'axe hypothalamo-hypophysaire entraînant des effets histopathologiques et fonctionnels.

Il est globalement difficile de décrire un mécanisme d'action unique responsable des effets néfastes observés au sein des organes cibles de la MC-LR. La MC-LR semble avoir une toxicité passant par de multiples processus (Vichi *et al.*, 2016 ; Buratti *et al.*, 2017) où la PP2A semble avoir un rôle crucial. Après inhibition de la PP2A, l'état hyperphosphorylé des cellules cibles entraînerait une cascade de réactions cellulaires à travers différentes voies, responsables des altérations du cytosquelette, du stress oxydant, de l'apoptose menant aux effets histopathologiques et fonctionnels observés au sein des organes.

4. Recueil des valeurs toxicologiques de référence

L'ensemble des VTR construites par les différents organismes nationaux ou internationaux est recensé dans le tableau 2.

4.1 VTR aiguës par voie orale.

Aucune VTR aiguë par voie orale n'a été construite à ce jour pour la MC-LR.

4.2 VTR subchroniques par voie orale.

En 1998, l'Organisation Mondiale de la Santé a proposé une VTR de $0,04 \mu\text{g.kg pc}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ pour la MC basée sur l'étude de Fawell *et al.* (1994) dans laquelle la MC-LR pure est administrée par gavage à des souris pendant 13 semaines. La NOAEL déduite par les auteurs est de $40 \mu\text{g.kg pc}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$. L'OMS a appliqué un facteur d'incertitude de 1000 (100 pour les variations intra et inter-espèces et 10 pour le manque de données sur la toxicité chronique et la cancérogénicité) (OMS, 1998).

Le National Health and Medical Research Council a proposé un Apport Quotidien Tolérable (AQT) de $0,04 \mu\text{g.kg pc}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ basé sur la même étude source que l'OMS en appliquant un facteur d'incertitude de 1000 (100 pour les variations intra et inter espèces et 10 pour le manque de données sur la toxicité chronique et la cancérogénicité) (NHMRC, 2004).

L'Institut National de Santé Publique du Québec (2005) utilise également l'étude de Fawell *et al.* (1994) pour dériver une VTR de $0,4 \mu\text{g.kg pc}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ en appliquant un facteur d'incertitude de 100 pour les variations inter et intra-espèces à la NOAEL de $40 \mu\text{g.kg pc}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$.

En 2008, le NHMRC a dérivé une VTR de $0,02 \mu\text{g.kg pc}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ en se basant sur l'étude de Kuiper Goodman *et al.* (1999) réalisée chez le porc pendant 44 jours avec la MC-LR. Une LOAEL de $100 \mu\text{g.kg pc}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ est déterminée. Le NHMRC lui a appliqué un facteur d'incertitude de 5000 (100 pour les variations intra et inter-espèces, 10 pour la cancérogénicité et 5 pour l'utilisation d'une LOAEL plutôt qu'une NOAEL) (NHMRC, 2008).

Santé Canada a proposé, en 2012, une VTR de $0,4 \mu\text{g.kg pc}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$, identique à celle de l'INSPQ, en utilisant l'étude de Fawell *et al.* (1994) (Santé Canada, 2012).

En 2015, une Reference Dose (RfD) de $0,05 \mu\text{g.kg pc}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ a été calculée par l'US EPA en utilisant comme étude source celle de Heinze (1999) dans laquelle la MC-LR pure est administrée par voie orale *via* l'eau de boisson à des rats pendant 28 jours. La LOAEL déterminée est de $50 \mu\text{g.kg pc}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$. L'US EPA applique un facteur d'incertitude de 1000 (100 pour les variations intra et inter-espèces, 3 pour l'utilisation d'une LOAEL au lieu d'une NOAEL et 3 pour l'incertitude dans les données (données sur la cancérogénicité, sur les effets systémiques, sur la neurotoxicité et sur les effets sur le développement et la reproduction) (US EPA, 2015a et b).

En utilisant l'étude de Heinze (1999), Santé Canada propose, en 2016, un AQT de $0,056 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ en appliquant à la LOAEL un facteur d'incertitude de 900 (100 pour les variations intra et inter-espèces, 3 pour le manque de données (non précisé) et 3 pour l'utilisation d'une LOAEL plutôt que d'une NOAEL) (Santé-Canada, 2016).

1.1 VTR chroniques par voie orale

1.1.1 VTR à seuil

Aucune VTR à seuil n'a été construite à notre connaissance pour la microcystine-LR.

1.1.2 VTR sans seuil pour les effets cancérigènes

Aucune VTR sans seuil pour les effets cancérigènes n'a été construite à ce jour pour la microcystine-LR.

Tableau 2 : Recensement des valeurs toxicologiques de références par voie orale pour la microcystine-LR

Organisme (année)	Etude source	Dose critique Effet critique	UF	VTR Niveau de confiance
OMS (1998)	Fawell <i>et al.</i> 1994 MC-LR pure administrée par gavage à des souris pendant 13 semaines	NOAEL = $40 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ basée sur les dommages hépatiques observés	1000 UF _A = 10 UF _H = 10 UF _L = 1 UF _S = 1 UF _D = 10	VTR = $0,04 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$
NHMRC (2004) (EDCH)	Fawell <i>et al.</i> 1994 MC-LR pure administrée par gavage à des souris pendant 13 semaines	NOAEL = $40 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ basée sur les dommages hépatiques observés	1000 UF _A = 10 UF _H = 10 UF _L = 1 UF _S = 1 UF _D = 10	AQT = $0,04 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$
INSPQ (2005)	Fawell <i>et al.</i> 1994 MC-LR pure administrée par gavage à des souris pendant 13 semaines	NOAEL = $40 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ basée sur les dommages hépatiques observés	100 UF _A = 10 UF _H = 10 UF _L = 1 UF _S = 1	VTR = $0,4 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$

			UF _D = 1	
NHMRC (2008) (Eaux récréatives)	Kuiper-Goodman <i>et al.</i> 1999 MC-LR administrée à des porcs pendant 44 jours.	LOAEL = 100 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	5000 UF _A = 10 UF _H = 10 UF _L = 5 UF _S = 1 UF _D = 10	VTR = 0,02 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹
Santé Canada (2012) (EDCH et eaux récréatives)	Fawell <i>et al.</i> 1994 MC-LR pure administrée par gavage à des souris pendant 13 semaines	NOAEL = 40 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ basée sur les dommages hépatiques observés	100 UF _A = 10 UF _H = 10 UF _L = 1 UF _S = 1 UF _D = 1	VTR = 0,4 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹
US EPA (2015)	Heinze 1999 MC-LR pure administrée par voie orale <i>via</i> l'eau de boisson à des rats pendant 28 jours	LOAEL = 50 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ basée sur les dommages hépatiques observés.	1000 UF _A = 10 UF _H = 10 UF _L = 3 UF _S = 1 UF _D = 3	RfD = 0,05 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹
Santé Canada (2016) (EDCH)	Heinze 1999 MC-LR pure administrée par voie orale <i>via</i> l'eau de boisson à des rats pendant 28 jours	LOAEL = 50 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ basée sur les dommages hépatiques observés.	900 UF _A = 10 UF _H = 10 UF _L = 3 UF _S = 1 UF _D = 3	AQT = 0,056 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹

5. Proposition de VTR subchronique par voie orale

5.1 Choix de l'effet critique

Initialement considérée comme une toxine hépatique, la MC-LR administrée par voie orale (eau de boisson ou gavage) est également capable d'exercer une action toxique sur de nombreux autres organes ou systèmes (reprotoxicité, neurotoxicité, toxicité pulmonaire, carcinogénicité, etc.) à des doses plus faibles.

A la suite de l'analyse des études qui ont permis de définir des NOAEL/LOAEL inférieures à $40 \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (plus faible NOAEL retenue pour élaborer des VTR), le CES a retenu l'effet reprotoxique comme effet critique.

Les effets sur la reproduction les plus pertinents sont observés au niveau de l'appareil reproducteur mâle, d'un point de vue histologique mais aussi fonctionnel. Les principaux effets observés sont : la réduction de la qualité spermatique par altération des tubes séminifères, des cellules de Leydig, des cellules germinales et des cellules de Sertoli. L'exposition à la MC-LR aboutit aussi tant chez la souris que le rat à un hypogonadisme non compensé par diminution de la testostérone sérique sans augmentation de la LH et la FSH circulantes. Enfin, quelques effets sur la fertilité féminine ont été observés chez la souris et le rat.

Le choix de cet effet critique permet d'être protecteur vis-à-vis de l'ensemble des effets adverses observés lors d'une exposition par voie orale à la MC-LR au regard des faibles doses auxquelles la reprotoxicité est observée.

Ainsi, compte tenu :

- **du nombre de données émergentes mettant en évidence les effets de la MC-LR sur l'appareil reproducteur chez le rongeur par voie orale ;**
- **de la gamme de dose d'exposition très basse à laquelle les effets surviennent ;**

Le CES retient comme effet critique pertinent pour l'homme l'altération de la qualité spermatique comprenant la diminution de la mobilité spermatique et du nombre de spermatozoïdes et l'augmentation du nombre d'anomalies spermatiques. Il est également important de noter que les autres altérations testiculaires (histologiques et production de testostérone) surviennent aux mêmes doses que celles observées pour la qualité spermatique.

5.2 Analyse des VTR existantes

Les différentes VTR subchroniques proposées à ce jour se basent sur 3 études (Fawell *et al.*, 1994 ; Heinze *et al.*, 1999 ; Kuiper-Goodman *et al.*, 1999) mettant en évidence des effets adverses observés au niveau hépatique proposant des LOAEL/NOAEL supérieures à $40 \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$.

Au vu du nombre d'études sur la toxicité par voie orale (*via* l'eau de boisson ou par gavage) chez le rongeur publiées ces dernières années démontrant une apparition d'effets adverses (notamment une hépatotoxicité, reprotoxicité et neurotoxicité) à des doses d'exposition égales ou inférieures à la NOAEL actuelle de $40 \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$, il apparaît nécessaire d'établir une VTR subchronique plus protectrice permettant ainsi de couvrir tous les nouveaux effets mis en évidence ces dernières années lors d'une exposition subchronique à des faibles doses de MC-LR par voie orale.

Ainsi, compte tenu de ces observations, le CES ne retient pas les valeurs existantes et propose de construire une VTR subchronique par voie orale plus protectrice.

5.3 Construction de VTR

5.3.1 Choix de l'étude clé

Afin de sélectionner l'étude clé qui permet de construire une VTR subchronique par voie orale, toutes les études *in vivo* sur la toxicité de la reproduction de la MC-LR chez les rongeurs par voie orale (*via* l'eau de boisson ou par gavage) ont été analysées. Pour évaluer la robustesse de ces études, le logiciel ToxRTool a été utilisé afin de les classer à l'aide de la cotation de Klimisch. Le tableau récapitulatif des études sélectionnées et les scores obtenus avec ToxRTool se trouvent en annexes 3 et 4.

Cinq études (Chen *et al.*, 2011 ; Chen *et al.*, 2015 ; Wu *et al.* 2015 ; Chen *et al.*, 2017 ; Zhang *et al.* 2017b) s'avèrent de bonne qualité, et certaines sont classées 1 dans la cotation de Klimisch (protocoles respectant ceux des lignes directrices OCDE ou autres). Toutes ces études ont été réalisées au sein du même laboratoire, qui est le seul à travailler sur la reprotoxicité de la MC-LR au niveau mondial. Des collaborations ont été réalisées avec d'autres laboratoires en fonction de l'aspect reprotoxique spécifique étudié (prostate, sperme, ovaires, etc). Ces études ont toutes été réalisées sur des souris Balb/c (souche très bien caractérisée au niveau du fond génétique et très utilisées dans les études de toxicologie), de type SPF (évitant la contamination par d'autres germes).

Parmi toutes les études, le CES a décidé de retenir comme étude clé celle de Chen *et al.* (2011) pour les raisons suivantes :

- La qualité de l'étude, classée 1 selon la classification de Klimisch ;
- La gamme de dose étudiée relativement basse (0 ; 1 ; 3,2 et $10 \mu\text{g.L}^{-1}$) ;
- L'existence d'une relation dose-réponse pour plusieurs effets reprotoxiques (qualité spermatique, augmentation du taux de LH/FSH et diminution du taux de testostérone) ;

- Il s'agit de l'étude où les effets reprotoxiques surviennent à la dose la plus faible ($3,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ soit $0,48 \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$) ;
- La possibilité de déterminer une NOAEL ;
- De plus, les auteurs apportent une preuve de concept expliquant le mécanisme à l'origine de l'altération de la qualité spermatique : un effet perturbateur endocrinien diminuant la sécrétion de testostérone (confirmé sur la descendance : Zhang *et al.*, 2017b) par altération des cellules de Leydig et s'accompagnant d'une augmentation de la LH/FSH du fait de l'absence de rétrocontrôle négatif par la testostérone, qui pourrait également être lié à une neurotoxicité directe de la MC-LR au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire.

5.3.2 Choix de la dose critique

Les préconisations de méthodologie suggèrent de privilégier la construction d'une Benchmark Dose (BMD) chaque fois que les données disponibles le permettent, de retenir une NOAEL en second choix et une LOAEL en dernière option (Anses, 2017).

Une Benchmark Dose (BMD) a pu être modélisée à partir d'une relation dose-réponse entre la diminution de la mobilité spermatique et l'exposition quotidienne à la MC-LR durant 3 mois (Annexe 5). Néanmoins :

- Le ratio BMD/BMDL est supérieur à 10
- La BMD obtenue est 14 fois plus basse que la première dose expérimentale testée

Or, d'après les recommandations du logiciel BMDS Wizard développé par ICF International (ICF BMDS Wizard), un ratio BMD/BMDL qui dépasse 5 et une BMD plus de trois fois plus petite que la première dose expérimentale testée suggère un manque de robustesse de la modélisation obtenue. Il a donc été décidé de ne pas retenir cette BMDL et de retenir la NOAEL.

$$\text{NOAEL} = 1 \mu\text{g.L}^{-1}$$

Cette NOAEL correspond à une concentration de microcystine dans l'eau. Un facteur de conversion de 0,15 recommandé par l'EFSA (EFSA, 2012)⁵ a été utilisé par défaut pour obtenir une dose quotidienne d'exposition subchronique chez la souris.

$$\text{NOAEL} = 0,15 \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$$

5.3.3 Ajustement allométrique

⁵ Ce facteur a été établi par le NTP à partir de 8 études de toxicité dans lesquelles figuraient la consommation d'eau de boisson et le poids corporel des animaux testés (rats ou souris).

Pour réduire la valeur de l'incertitude sur la variabilité inter-espèce, un ajustement allométrique a été réalisé. Une dose équivalente humaine (HED = Human Equivalent Dose) est calculée à l'aide de l'équation suivante⁶ :

$$\text{Dose équivalente Homme} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids homme}} \right)^{1/4}$$

En l'absence de données moyennes concernant le poids des souris de l'étude, un poids moyen de 25 g a été utilisé, comme préconisé par l'US EPA (US EPA, 2006). Celui utilisé pour l'Homme pour le calcul est de 70 kg.

$$\text{NOAEL}_{\text{HED}} = 0,15 \times (0,025 / 70)^{1/4} = 0,02 \mu\text{g.kg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$$

5.3.4 Choix des facteurs d'incertitude

Le calcul de la VTR à partir de Chen *et al.* (2011) a été effectué à l'aide des facteurs d'incertitude suivants (Anses, 2017) :

- Variabilité inter-espèces (UF_A) : 2,5

L'ajustement dosimétrique réalisé a permis de calculer une dose équivalente humaine, à l'aide de l'équation précédente. Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixé à 2,5 selon les recommandations de l'IPCS (IPCS, 2005) et sur la base des pratiques de l'Anses.

- Variabilité interindividuelle (UF_H) : 10

En l'absence de connaissance sur l'existence de sous population sensible, une valeur finale de 10 par défaut a été choisie pour la variabilité intra-espèce.

Un facteur d'incertitude global de 25 est donc utilisé pour la construction de la VTR.

5.3.5 Proposition de VTR subchronique par voie orale

$$\text{VTR} = \text{NOAEL}_{\text{HED}} / \text{UF} = 0,02 / 25 = 0,0008 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc} \cdot \text{j}^{-1} = 1 \text{ ng.kg}^{-1} \text{ pc} \cdot \text{j}^{-1}$$

5.3.6 Niveau de confiance

Le niveau de confiance global a été attribué à cette VTR en se basant sur les critères suivants :

- Niveau de confiance dans la nature et la qualité du corpus de données : **Fort**

⁶ Cette équation est issue des recommandations de l'US EPA (US EPA, 2006).

L'analyse bibliographique a révélé de nombreuses études sur la microcystine-LR dont beaucoup de bonne qualité.

- Niveau de confiance dans le choix de l'effet critique et le mode d'action : **Moyen à fort**

La nature de l'effet critique observé est bien décrit par les auteurs, et d'autres études réalisées chez le rongeur convergent vers cet effet.

- Niveau de confiance dans le choix de l'étude clé : **Moyen**

L'étude est de bonne qualité au regard de la pureté de la substance testée, du choix des doses testées et de la durée de l'étude (90 et 180 jours). Néanmoins, l'étude est issue de la seule équipe de recherche travaillant sur les effets sur la reproduction de la MC-LR lors d'une exposition par voie orale.

- Niveau de confiance dans le choix de la dose critique : **Moyen à fort**

La Benchmark dose modélisée à partir d'une relation dose-réponse observée n'a pas pu être retenue. Le couple LOAEL/NOAEL est de bonne qualité au regard du nombre de doses testées, du faible écart entre ces doses et de la présence de multiples relations dose-réponse.

Le niveau de confiance global pour cette VTR est donc **Moyen**.

6. Conclusions du CES

Une VTR subchronique par voie orale est proposée pour la microcystine basée sur la diminution de la qualité spermatique (Tableau 3). Un niveau de confiance a été attribué à cette VTR.

Tableau 3 : VTR subchronique par voie orale pour la microcystine-LR

Effet critique (étude clé)	Concentration critique	UF	VTR
Altération de la qualité spermatique Chen <i>et al.</i> (2011)	NOAEL = 1 µg.L ⁻¹ = 0,15 µg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹	25	1 ng.kg pc⁻¹.j⁻¹
	<u>Ajustement allométrique</u> NOAEL _{HED} = 0,02 µg.kg pc ⁻¹ .j ⁻¹	UF _A : 2.5 UF _D : 10	Indice de confiance Moyen

Recommandations éventuelles

Date de validation du rapport d'expertise collective par le comité d'experts spécialisé : le 13/09/2018.

Signature :

Maisons-Alfort, le _____,

Au nom des experts du CES

« Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence »,

M Michiels

Président du CES

Bibliographie

- Abramsson-Zetterberg, L., U. B. Sundh, et R. Mattsson. 2010. "Cyanobacterial extracts and microcystin-LR are inactive in the micronucleus assay *in vivo* and *in vitro*." *Mutation Research* 699 (1-2):5-10. doi: 10.1016/j.mrgentox.2010.04.001.
- Anses (Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'environnement de l'alimentation et du travail). 2017. "Valeurs Toxicologiques de références (VTR) : Guide d'élaboration de VTR de l'Anses." : Anses. 181 p.
- Barford, D., A. K. Das, et M. P. Egloff. 1998. "The structure and mechanism of protein phosphatases : insights into catalysis and regulation." *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 27:133-164. doi: 10.1146/annurev.biophys.27.1.133.
- Briand, E., C. Yepremian, J. F. Humbert, et C. Quiblier. 2008. "Competition between microcystin- and non-microcystin-producing *Planktothrix agardhii* (cyanobacteria) strains under different environmental conditions." *Environmental Microbiology Reports* 10 (12):3337-3348. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01730.x.
- Bu, Y. Z., X. Y. Li, B. J. Zhang, I. K. Chung, et J. A. Lee. 2006. "Microcystins cause embryonic toxicity in mice." *Toxicol* 48 (8):966-972. doi: 10.1016/j.toxicol.2006.07.038.
- Buratti, F. M., M. Manganelli, S. Vichi, M. Stefanelli, S. Scardala, E. Testai, et E. Funari. 2017. "Cyanotoxins : producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation." *Archives of Toxicology* 91 (3):1049-1130. doi: 10.1007/s00204-016-1913-6.
- Buratti, F. M., S. Scardala, E. Funari, et E. Testai. 2011. "Human glutathione transferases catalyzing the conjugation of the hepatotoxin microcystin-LR." *Chemical Research in Toxicology* 24 (6):926-933. doi: 10.1021/tx2000976.
- Buratti, F. M., et E. Testai. 2015. "Species- and congener-differences in microcystin-LR and -RR GSH conjugation in human, rat, and mouse hepatic cytosol." *Toxicology Letters* 232 (1):133-140. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.10.020.
- Campos, A., et V. Vasconcelos. 2010. "Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells." *International Journal of Molecular Sciences* 11 (1):268-287. doi: 10.3390/ijms11010268.
- Carmichael, W. W. 1988. "Handbook of Natural Toxins." Dans *Toxins of freshwater algae*, 121-147. New York: Marcel Dekker.
- Carmichael, W. W., J. W. He, J. Eschedor, Z. R. He, et Y. M. Juan. 1988. "Partial structural determination of hepatotoxic peptides from *Microcystis aeruginosa* (cyanobacterium) collected in ponds of central China." *Toxicol* 26 (12):1213-1217. doi: 10.1016/0041-0101(88)90307-8.

- Catherine, A., C. Bernard, L. Spooft, et M. Bruno. 2017. "Microcystins and Nodularins." Dans *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*, édité par J. A. Meriluoto, L. Spooft et G.A. Codd. : John Wiley & Sons, Ltd.
- Chen, Y., J. Xu, Y. Li, et X. Han. 2011. "Decline of sperm quality and testicular function in male mice during chronic low-dose exposure to microcystin-LR." *Reproductive Toxicology* 31 (4):551-557. doi: 10.1016/j.reprotox.2011.02.006.
- Chen, L., X. Zhang, W. Zhou, Q. Qiao, H. Liang, G. Li, J. Wang, et F. Cai. 2013a. "The interactive effects of cytoskeleton disruption and mitochondria dysfunction lead to reproductive toxicity induced by microcystin-LR." *PLoS One* 8 (1):e53949. doi: 10.1371/journal.pone.0053949.
- Chen, Y., Y. Zhou, X. Wang, W. Qian, et X. Han. 2013b. "Microcystin-LR induces autophagy and apoptosis in rat Sertoli cells in vitro." *Toxicol* 76:84-93. doi: 10.1016/j.toxicol.2013.09.005.
- Chen, L., S. Li, X. Guo, P. Xie, et J. Chen. 2016a. "The role of GSH in microcystin-induced apoptosis in rat liver : Involvement of oxidative stress and NF- κ B." *Environmental Toxicology* 31 (5):552-560. doi: 10.1002/tox.22068.
- Chen, Y., Y. Zhou, J. Wang, L. Wang, Z. Xiang, D. Li, et X. Han. 2016b. "Microcystin-Leucine Arginine causes cytotoxic effects in Sertoli cells resulting in reproductive dysfunction in male Mice." *Scientific Reports* 6:39238. doi: 10.1038/srep39238.
- Chen, L., J. Chen, X. Zhang, et P. Xie. 2016c. "A review of reproductive toxicity of microcystins." *Journal of Hazardous Materials* 301:381-399. doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.08.041.
- Chen, Y., J. Wang, Q. Zhang, Z. Xiang, D. Li, et X. Han. 2017. "Microcystin-leucine arginine exhibits immunomodulatory roles in testicular cells resulting in orchitis." *Environmental Pollution* 229:964-975. doi: 10.1016/j.envpol.2017.07.081.
- Chen, Y., J. Wang, C. Pan, D. Li, et X. Han. 2018. "Microcystin-leucine-arginine causes blood-testis barrier disruption and degradation of occludin mediated by matrix metalloproteinase-8." *Cellular & Molecular Biology Letters* 75 (6):1117-1132. doi: 10.1007/s00018-017-2687-6.
- Cheng, X., J. Maher, M. Z. Dieter, et C. D. Klaassen. 2005. "Regulation of mouse organic anion-transporting polypeptides (OATPs) in liver by prototypical microsomal enzyme inducers that activate distinct transcription factor pathways." *Drug Metabolism and Disposition* 33 (9):1276-1282. doi: 10.1124/dmd.105.003988.
- Chorus, I. 2001. *Cyanotoxins : occurrence, causes, consequences*. New-York: Springer.
- CIRC 2010. "Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide toxins." *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human* Volume 94 (CIRC)
- Codd, G. A., L. F. Morrison, et J. S. Metcalf. 2005. "Cyanobacterial toxins: risk management for health protection." *Toxicology and Applied Pharmacology* 203 (3):264-272. doi: 10.1016/j.taap.2004.02.016.
- Craig, M., H. A. Luu, T. L. McCreedy, D. Williams, R. J. Andersen, et C. F. Holmes. 1996. "Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporin and microcystins with type-1 and type-2A protein phosphatases." *Biochemistry and Cell Biology* 74 (4):569-578.

- Dahlem, A. M., A. S. Hassan, S. P. Swanson, W. W. Carmichael, et V. R. Beasley. 1989. "A model system for studying the bioavailability of intestinally administered microcystin-LR, a hepatotoxic peptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*." *Pharmacology & Toxicology* 64 (2):177-181.
- De Reviere, B., 2002. *Biologie et phylogénie des algues : t.1*, Belin Sup Sciences : biologie. Belin, Paris. 352 p.
- De Reviere, B. 2003. *Biologie et phylogénie des algues : t.2*, Belin Sup Sciences : biologie. Belin, Paris. 255p.
- Dias, E., H. Louro, M. Pinto, T. Santos, S. Antunes, P. Pereira, et M. J. Silva. 2014. "Genotoxicity of microcystin-LR *in vitro* and *in vivo* experimental models." *BioMed Research International* 2014:949521. doi: 10.1155/2014/949521.
- Ding, W. X., H. M. Shen, H. G. Zhu, B. L. Lee, et C. N. Ong. 1999. "Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China." *Mutation Research* 442 (2):69-77.
- Ding, W. X., et C. Nam Ong. 2003. "Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity." *FEMS Microbiology Letters* 220 (1):1-7.
- Ding, X. S., X. Y. Li, H. Y. Duan, I. K. Chung, et J. A. Lee. 2006. "Toxic effects of *Microcystis* cell extracts on the reproductive system of male mice." *Toxicol* 48 (8):973-979. doi: 10.1016/j.toxicol.2006.07.039.
- Ding, J., J. Wang, Z. Xiang, W. Diao, M. Su, W. Shi, T. Wan, et X. Han. 2017. "The organic anion transporting polypeptide 1a5 is a pivotal transporter for the uptake of microcystin-LR by gonadotropin-releasing hormone neurons." *Aquatic Toxicology* 182:1-10. doi: 10.1016/j.aquatox.2016.11.005.
- Dong, L., L. Duan, H. Zhang, X. Cheng. 2008. "Study on DNA-protein crosslinks of certain organs of mice induced by microcystin-LR." *Wei Sheng Yan Jiu* 37 (2):144-146.
- Douglas, P., G. B. Moorhead, R. Ye, et S. P. Lees-Miller. 2001. "Protein phosphatases regulate DNA-dependent protein kinase activity." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (22):18992-18998. doi: 10.1074/jbc.M011703200.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2016. "Review and analysis of occurrence, exposure and toxicity of cyanobacteria toxins in food." Disponible sur : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/sp.efsa.2016.EN-998/epdf>.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2017. "Update: use of the benchmark dose approach in risk assessment." ; 41pp. Disponible sur <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4658>
- Eriksson, J. E., L. Grönberg, S. Nygård, J. P. Slotte, et J. A. O. Meriluoto. 1990. "Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1025 (1):60-66. doi: 10.1016/0005-2736(90)90190-Y.
- Falconer, I. R., T. Buckley, et M. T. C. Runnegar. 1986. "Biological half-life, organ distribution and excretion of 125I-labelled toxic peptide from the blue-green alga *microcystis aeruginosa*." *Australian Journal of Biological Sciences* 39 (1):17-21. doi: 10.1071/BI9860017.

- Falconer, I. R., M. Dornbusch, G. Moran, et S. K. Yeung. 1992. "Effect of the cyanobacterial (blue-green algal) toxins from *Microcystis aeruginosa* on isolated enterocytes from the chicken small intestine." *Toxicon* 30 (7):790-793. doi: 10.1016/0041-0101(92)90016-X.
- Fawell, J. K., R. E. Mitchell, D. J. Everett, et R. E. Hill. 1999. "The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse : I microcystin-LR." *Human & Experimental Toxicology* 18 (3):162-167. doi: 10.1177/096032719901800305.
- Feitz, A. J., T. Lukondeh, M. C. Moffitt, B. P. Burns, D. Naidoo, J. Della Vedova, J. M. Gooden, et B. A. Neilan. 2002. "Absence of detectable levels of the cyanobacterial toxin (microcystin-LR) carry-over into milk." *Toxicon* 40 (8):1173-1180.
- Feurstein, D., K. Holst, A. Fischer, et D. R. Dietrich. 2009. "Oatp-associated uptake and toxicity of microcystins in primary murine whole brain cells." *Toxicology and Applied Pharmacology* 234 (2):247-255. doi: 10.1016/j.taap.2008.10.011.
- Feurstein, D., J. Kleinteich, A. H. Heussner, K. Stemmer, et D. R. Dietrich. 2010. "Investigation of microcystin congener-dependent uptake into primary murine neurons." *Environmental Health Perspectives* 118 (10):1370-1375. doi: 10.1289/ehp.0901289.
- Fischer, W. J., S. Altheimer, V. Cattori, P. J. Meier, D. R. Dietrich, et B. Hagenbuch. 2005. "Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin." *Toxicology and Applied Pharmacology* 203 (3 SPEC. ISS.):257-263. doi: 10.1016/j.taap.2004.08.012.
- Fischer, A., S. J. Hoeger, K. Stemmer, D. J. Feurstein, D. Knobeloch, A. Nussler, et D. R. Dietrich. 2010. "The role of organic anion transporting polypeptides (OATPs/SLCOs) in the toxicity of different microcystin congeners *in vitro*: A comparison of primary human hepatocytes and OATP-transfected HEK293 cells." *Toxicology and Applied Pharmacology* 245 (1):9-20. doi: 10.1016/j.taap.2010.02.006.
- Fitzgeorge, R.B., S.A. Clark, et C.W. Keevil. 1994. "Routes of intoxication." *Dans Detection methods for cyanobacterial toxins*, édité par G. A. Codd, Jefferies T.M., C.W. Keevil et E. Potter, 69-74. London: Royal Society of Chemistry.
- Fu, W. Y., J. P. Chen, X. M. Wang, et L. H. Xu. 2005. "Altered expression of p53, Bcl-2 and Bax induced by microcystin-LR *in vivo* and *in vitro*." *Toxicon* 46 (2):171-177. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.03.021.
- Gaudin, J., S. Huet, G. Jarry, et V. Fessard. 2008. "*In vivo* DNA damage induced by the cyanotoxin microcystin-LR: comparison of intra-peritoneal and oral administrations by use of the comet assay." *Mutation Research* 652 (1):65-71. doi: 10.1016/j.mrgentox.2007.10.024.
- Gehring, M. 2004. "Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response." *FEBS Letters* 557 (1-3):1-8. doi: 10.1016/s0014-5793(03)01447-9.
- Goldberg, J., H. B. Huang, Y. G. Kwon, P. Greengard, A. C. Nairn, et J. Kuriyan. 1995. "Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1." *Nature* 376 (6543):745-753. doi: 10.1038/376745a0.

- Greer, B., J. P. Meneely, et C. T. Elliott. 2018. "Uptake and accumulation of Microcystin-LR based on exposure through drinking water: An animal model assessing the human health risk." *Scientific Reports* 8 (1):4913. doi: 10.1038/s41598-018-23312-7.
- Guo, X., L. Chen, J. Chen, P. Xie, S. Li, J. He, W. Li, H. Fan, D. Yu, et C. Zeng. 2015. "Quantitatively evaluating detoxification of the hepatotoxic microcystin-LR through the glutathione (GSH) pathway in SD rats." *Environmental Science and Pollution Research International* 22 (23):19273-19284. doi: 10.1007/s11356-015-5531-2.
- Hao, L., P. Xie, H. Li, G. Li, Q. Xiong, Q. Wang, T. Qiu, et Y. Liu. 2010. "Transcriptional alteration of cytoskeletal genes induced by microcystins in three organs of rats." *Toxicol* 55 (7):1378-1386. doi: 10.1016/j.toxicol.2010.02.015.
- Harada, K., K. Matsuura, M. Suzuki, M. F. Watanabe, S. Oishi, A. M. Dahlem, V. R. Beasley, et W. W. Carmichael. 1990. "Isolation and characterization of the minor components associated with microcystins LR and RR in the cyanobacterium (blue-green algae)." *Toxicol* 28 (1):55-64.
- Harada, K., H. Murata, Z. Qiang, M. Suzuki, et F. Kondo. 1996. "Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria." *Toxicol* 34 (6):701-710.
- He, J., J. Chen, L. Wu, G. Li, et P. Xie. 2012. "Metabolic response to oral microcystin-LR exposure in the rat by NMR-based metabolomic study." *Journal of Proteome Research* 11 (12):5934-5946. doi: 10.1021/pr300685g.
- He, J., G. Li, J. Chen, J. Lin, C. Zeng, J. Chen, J. Deng, et P. Xie. 2017. "Prolonged exposure to low-dose microcystin induces nonalcoholic steatohepatitis in mice: a systems toxicology study." *Archives of Toxicology* 91 (1):465-480. doi: 10.1007/s00204-016-1681-3.
- Heinze, R. 1999. "Toxicity of the cyanobacterial toxin microcystin-LR to rats after 28 days intake with the drinking water." *Environmental Toxicology* 14 (1):57-60. doi: doi:10.1002/(SICI)1522-7278(199902)14:1<57::AID-TOX9>3.0.CO;2-J.
- Hermansky, S. J., P. J. Casey, et S. J. Stohs. 1990a. "Cyclosporin A — a chemoprotectant against microcystin-LR toxicity." *Toxicology Letters* 54 (2):279-285. doi: [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(90\)90195-R](https://doi.org/10.1016/0378-4274(90)90195-R).
- Hermansky, S. J., S. N. Wolff, et S. J. Stohs. 1990b. "Use of rifampin as an effective chemoprotectant and antidote against microcystin-LR toxicity." *Pharmacology* 41 (4):231-236. doi: 10.1159/000138723.
- Honkanen, R. E., J. Zwiller, R. E. Moore, S. L. Daily, B. S. Khatra, M. Dukelow, et A. L. Boynton. 1990. "Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases." *The Journal of Biological Chemistry* 265 (32):19401-19404.
- Hooser, S. B., M. S. Kuhlenschmidt, A. M. Dahlem, V. R. Beasley, W. W. Carmichael, et W. M. Haschek. 1991. "Uptake and subcellular localization of tritiated dihydro-microcystin-LR in rat liver." *Toxicol* 29 (6):589-601. doi: 10.1016/0041-0101(91)90053-T.
- Huang, P., et A. Xu. 2009. "Genotoxic effects of microcystin-LR in mammalian cells." 3rd *International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, iCBBE 2009*, Beijing.

- Huang, P., Q. Zheng, et L. H. Xu. 2011. "The apoptotic effect of oral administration of microcystin-RR on mice liver." *Environmental Toxicology* 26 (5):443-452. doi: 10.1002/tox.20570.
- Huang, X., Y. Zhang, W. Xiao, X. Ye, Q. Zhong, et K. Gu. 2013. "Comparison of response indices to toxic microcystin-LR in blood of mice." *Chemosphere* 92 (5):563-569. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.04.006.
- Huang, H., C. Liu, X. Fu, S. Zhang, Y. Xin, Y. Li, L. Xue, X. Cheng, et H. Zhang. 2016. "Microcystin-LR induced apoptosis in rat sertoli cells via the mitochondrial caspase-dependent pathway: Role of reactive oxygen species." *Frontiers in Physiology* 7 (SEP). doi: 10.3389/fphys.2016.00397.
- ICF BMSD Wizard. Recommendation logic. Disponible sur : <https://bmsd.readthedocs.io/en/latest/logic.html#bin-recommendation-logic> . Consulté le 31/08/2018
- INSPQ (Institut national de santé publique du Québec). 2004. "*Propositions de critères d'intervention et de seuils d'alerte pour les cyanobactéries.*" : Groupe scientifique sur l'eau : Unité Santé et environnement. . Disponible sur : <https://www.inspq.qc.ca/publications/348>
- IPCS (International Programm on Chemical Safety). 2005. "*Chemical-specific adjustment factors for interspecies differences and human variability: Guidance document for use of data in dose/concentration-response assessment.*" : 96pp Disponible sur : <http://apps.who.int/iris/handle/10665/43294?locale=fr>
- Ito, E., F. Kondo, et K. Harada. 1997a. "Hepatic necrosis in aged mice by oral administration of microcystin-LR." *Toxicol* 35 (2):231-239.
- Ito, E., F. Kondo, K. Terao, et K. Harada. 1997b. "Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR." *Toxicol* 35 (9):1453-1457.
- Ito, E., et H. Nagai. 2000. "Bleeding from the small intestine caused by aplysiatoxin, the causative agent of the red alga *Gracilaria coronopifolia* poisoning." *Toxicol* 38 (1):123-132.
- Ito, E., F. Kondo, et K. Harada. 2001. "Intratracheal administration of microcystin-LR, and its distribution." *Toxicol* 39 (2-3):265-271.
- Jasioneck, G., A. Zhdanov, J. Davenport, L. Blaha, et D. B. Papkovsky. 2010. "Mitochondrial toxicity of microcystin-LR on cultured cells: application to the analysis of contaminated water samples." *Environmental Science & Technology* 44 (7):2535-2541. doi: 10.1021/es903157h.
- Kleppe, R., L. Herfindal, et S. O. Doskeland. 2015. "Cell Death Inducing Microbial Protein Phosphatase Inhibitors--Mechanisms of Action." *Marine Drugs* 13 (10):6505-6520. doi: 10.3390/md13106505.
- Komatsu, M., T. Furukawa, R. Ikeda, S. Takumi, Q. Nong, K. Aoyama, S. Akiyama, D. Keppler, et T. Takeuchi. 2007. "Involvement of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in microcystin-LR-induced apoptosis after its selective uptake mediated by OATP1B1 and OATP1B3." *Toxicological Sciences* 97 (2):407-416. doi: 10.1093/toxsci/kfm054.

- Kondo, F., Y. Ikai, H. Oka, M. Okumura, N. Ishikawa, K. I. Harada, K. Matsuura, H. Murata, et M. Suzuki. 1992. "Formation, Characterization, and Toxicity of the Glutathione and Cysteine Conjugates of Toxic Heptapeptide Microcystins." *Chemical Research in Toxicology* 5 (5):591-596. doi: 10.1021/tx00029a002.
- Kondo, F., H. Matsumoto, S. Yamada, N. Ishikawa, E. Ito, S. Nagata, Y. Ueno, M. Suzuki, et K. I. Harada. 1996. "Detection and identification of metabolites of microcystins formed *in vivo* in mouse and rat livers." *Chemical Research in Toxicology* 9 (8):1355-1359. doi: 10.1021/tx960085a.
- Kuiper-Goodman, T., I. R. Falconer, et D.J. Fitzgerald. 1999. "Human Health aspects. In : *Toxic Cyanobacteria in Water : A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*." London: E & Fn Spon ; 113-153.
- Labine, M., et G. Y. Minuk. 2015. "Long-term, low-dose exposure to microcystin toxin does not increase the risk of liver tumor development or growth in mice." *Hepatology Research* 45 (6):683-692. doi: 10.1111/hepr.12394.
- Li, Y., J. Sheng, J. Sha, et X. Han. 2008. "The toxic effects of microcystin-LR on the reproductive system of male rats *in vivo* and *in vitro*." *Reproductive Toxicology* 26 (3-4):239-245. doi: 10.1016/j.reprotox.2008.09.004.
- Li, H., P. Xie, G. Li, L. Hao, et Q. Xiong. 2009. "*In vivo* study on the effects of microcystin extracts on the expression profiles of proto-oncogenes (c-fos, c-jun and c-myc) in liver, kidney and testis of male Wistar rats injected *i.v.* with toxins." *Toxicol* 53 (1):169-175. doi: 10.1016/j.toxicol.2008.10.027.
- Li, G. Y., P. Xie, H. Y. Li, L. Hao, Q. Xiong, et T. Qiu. 2011a. "Involvement of p53, Bax, and Bcl-2 pathway in microcystins-induced apoptosis in rat testis." *Environmental Toxicology* 26 (2):111-117. doi: 10.1002/tox.20532.
- Li, D., Z. Liu, Y. Cui, W. Li, H. Fang, M. Li, et Z. Kong. 2011b. "Toxicity of cyanobacterial bloom extracts from Taihu Lake on mouse, *Mus musculus*." *Ecotoxicology* 20 (5):1018-1025. doi: 10.1007/s10646-011-0693-2.
- Li, G., W. Yan, Q. Qiao, J. Chen, F. Cai, Y. He, et X. Zhang. 2012a. "Global effects of subchronic treatment of microcystin-LR on rat splenic protein levels." *Journal of Proteomics* 77:383-393. doi: 10.1016/j.jprot.2012.09.012.
- Li, G., F. Cai, W. Yan, C. Li, et J. Wang. 2012b. "A proteomic analysis of MCLR-induced neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease." *Toxicological Sciences* 127 (2):485-495. doi: 10.1093/toxsci/kfs114.
- Li, Y., et X. Han. 2012c. "Microcystin-LR causes cytotoxicity effects in rat testicular Sertoli cells." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 33 (2):318-326. doi: 10.1016/j.etap.2011.12.015.
- Li, G., W. Yan, F. Cai, C. Li, N. Chen, et J. Wang. 2014a. "Spatial learning and memory impairment and pathological change in rats induced by acute exposure to microcystin-LR." *Environmental Toxicology* 29 (3):261-268. doi: 10.1002/tox.21754.

- Li, X. B., X. Zhang, J. Ju, Y. Li, L. Yin, et Y. Pu. 2014b. "Alterations in neurobehaviors and inflammation in hippocampus of rats induced by oral administration of microcystin-LR." *Environmental Science and Pollution Research International* 21 (21):12419-12425. doi: 10.1007/s11356-014-3151-x.
- Li, S., J. Chen, P. Xie, X. Guo, H. Fan, D. Yu, C. Zeng, et L. Chen. 2015a. "The role of glutathione detoxification pathway in MCLR-induced hepatotoxicity in SD rats." *Environmental Toxicology* 30 (12):1470-1480. doi: 10.1002/tox.22017.
- Li, X., Q. Zhao, W. Zhou, L. Xu, et Y. Wang. 2015b. "Effects of chronic exposure to microcystin-LR on hepatocyte mitochondrial DNA replication in mice." *Environmental Science & Technology* 49 (7):4665-4672. doi: 10.1021/es5059132.
- Li, X., X. Zhang, J. Ju, Y. Li, L. Yin, et Y. Pu. 2015c. "Maternal repeated oral exposure to microcystin-LR affects neurobehaviors in developing rats." *Environmental Toxicology and Chemistry* 34 (1):64-9. doi: 10.1002/etc.2765.
- Li, X., L. Xu, W. Zhou, Q. Zhao, et Y. Wang. 2016. "Chronic exposure to microcystin-LR affected mitochondrial DNA maintenance and caused pathological changes of lung tissue in mice." *Environmental Pollution* 210:48-56. doi: 10.1016/j.envpol.2015.12.001.
- Liu, J., et Y. Sun. 2015. "The role of PP2A-associated proteins and signal pathways in microcystin-LR toxicity." *Toxicology Letters* 236 (1):1-7. doi: 10.1016/j.toxlet.2015.04.010.
- Liu, J., B. Wang, P. Huang, H. Wang, K. Xu, X. Wang, L. Xu, et Z. Guo. 2016a. "Microcystin-LR promotes cell proliferation in the mice liver by activating Akt and p38/ERK/JNK cascades." *Chemosphere* 163:14-21. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.08.002.
- Liu, J., H. Wang, B. Wang, T. Chen, X. Wang, P. Huang, L. Xu, et Z. Guo. 2016b. "Microcystin-LR promotes proliferation by activating Akt/S6K1 pathway and disordering apoptosis and cell cycle associated proteins phosphorylation in HL7702 cells." *Toxicology Letters* 240 (1):214-225. doi: 10.1016/j.toxlet.2015.10.015.
- Liu, H., X. Zhang, S. Zhang, H. Huang, J. Wu, Y. Wang, L. Yuan, C. Liu, X. Zeng, X. Cheng, D. Zhuang et H. Zhang. 2018. "Oxidative Stress Mediates Microcystin-LR-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in Kk-1 Cells and C57bl/6 Mice Ovaries." *Frontiers in Physiology* 9 (2018): 1058.
- Lovell, R. A., D. J. Schaeffer, S. B. Hooser, W. M. Haschek, A. M. Dahlem, W. W. Carmichael, et V. R. Beasley. 1989. "Toxicity of intraperitoneal doses of microcystin-LR in two strains of male mice." *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 9 (3):221-238.
- Lowe, J., J. Souza-Menezes, D. S. Freire, L. J. Mattos, R. C. Castiglione, C. M. Barbosa, L. Santiago, F. M. Ferrao, L. H. Cardoso, R. T. da Silva, H. J. Vieira-Beiral, A. Vieyra, M. M. Morales, S. M. Azevedo, et R. M. Soares. 2012. "Single sublethal dose of microcystin-LR is responsible for different alterations in biochemical, histological and physiological renal parameters." *Toxicon* 59 (6):601-609. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.02.003.
- Lu, H., S. Choudhuri, K. Ogura, I. L. Csanaky, X. Lei, X. Cheng, P. Z. Song, et C. D. Klaassen. 2008. "Characterization of organic anion transporting polypeptide 1b2-null Mice: Essential role in

hepatic uptake/toxicity of phalloidin and microcystin-Lr." *Toxicological Sciences* 103 (1):35-45. doi: 10.1093/toxsci/kfn038.

MacKintosh, C., K. A. Beattie, S. Klumpp, P. Cohen, et G. A. Codd. 1990. "Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants." *FEBS Letters* 264 (2):187-192.

MacKintosh, R. W., K. N. Dalby, D. G. Campbell, P. T. Cohen, P. Cohen, et C. MacKintosh. 1995. "The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1." *FEBS Letters* 371 (3):236-240.

Maynes, J. T., K. R. Perreault, M. M. Cherney, H. A. Luu, M. N. James, et C. F. Holmes. 2004. "Crystal structure and mutagenesis of a protein phosphatase-1:calcineurin hybrid elucidate the role of the beta12-beta13 loop in inhibitor binding." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (41):43198-43206. doi: 10.1074/jbc.M407184200.

Maynes, J. T., H. A. Luu, M. M. Cherney, R. J. Andersen, D. Williams, C. F. Holmes, et M. N. James. 2006. "Crystal structures of protein phosphatase-1 bound to motuporin and dihydromicrocystin-LA: elucidation of the mechanism of enzyme inhibition by cyanobacterial toxins." *Journal of Molecular Biology* 356 (1):111-120. doi: 10.1016/j.jmb.2005.11.019.

Meng, G., J. Liu, S. Lin, Z. Guo, et L. Xu. 2015. "Microcystin-LR-caused ROS generation involved in p38 activation and tau hyperphosphorylation in neuroendocrine (PC12) cells." *Environmental Toxicology* 30 (3):366-374. doi: 10.1002/tox.21914.

Meng, X., L. Zhang, X. Chen, Z. Xiang, D. Li, et X. Han. 2016. "miR-541 contributes to Microcystin-LR-induced reproductive toxicity through regulating the expression of p15 in Mice." *Toxins* 8 (9). doi: 10.3390/toxins8090260.

Meriluoto, J. A. O., S. E. Nygård, A. M. Dahlem, et J. E. Eriksson. 1990. "Synthesis, organotropism and hepatocellular uptake of two tritium-labeled epimers of dihydromicrocystin-LR, a cyanobacterial peptide toxin analog." *Toxicon* 28 (12):1439-1446. doi: 10.1016/0041-0101(90)90157-3.

Miura, G. A., N. A. Robinson, W. B. Lawrence, et J. G. Pace. 1991. "Hepatotoxicity of microcystin-LR in fed and fasted rats." *Toxicon* 29 (3):337-346. doi: 10.1016/0041-0101(91)90287-2.

Namikoshi, M., B. W. Choi, F. Sun, K. L. Rinehart, W. R. Evans, et W. W. Carmichael. 1993. "Chemical characterization and toxicity of dihydro derivatives of nodularin and microcystin-LR, potent cyanobacterial cyclic peptide hepatotoxins." *Chemical Research in Toxicology* 6 (2):151-158.

NHMRC (National Health and Medical Research Council). 2004. "Australian drinking water guidelines 6." .

NHMRC (National Health and Medical Research Council). 2008. "Guidelines for Managing Risks in Recreational Water." : 216p Disponible sur : https://www.nhmrc.gov.au/_files_nhmrc/publications/attachments/eh38.pdf

Nishiwaki, R., T. Ohta, E. Sueoka, M. Suganuma, K. Harada, M. F. Watanabe, et H. Fujiki. 1994. "Two significant aspects of microcystin-LR : specific binding and liver specificity." *Cancer Letters* 83 (1-2):283-289.

Nishiwaki-Matsushima, R., S. Nishiwaki, T. Ohta, S. Yoshizawa, M. Suganuma, K. Harada, M. F. Watanabe, et H. Fujiki. 1991. "Structure-function relationships of microcystins, liver tumor promoters, in interaction with protein phosphatase." *Japanese Journal of Cancer Research* 82 (9):993-996.

Nishiwaki-Matsushima, R., T. Ohta, S. Nishiwaki, M. Suganuma, K. Kohyama, T. Ishikawa, W. W. Carmichael, et H. Fujiki. 1992. "Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 118 (6):420-424.

Nong, Q., M. Komatsu, K. Izumo, H.P. Indo, K. Xu, K. Aoyama, H.J. Majima, M. Horiuchi, K. Morimoto, et T. Takeuchi. 2007. "Involvement of reactive oxygen species in Microcystin-LR Induced cytogenotoxicity." *Free Radical Research* 41 (12):1326-1337.

OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economique). 2015. Overview of the Set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and Updates Performed in 2014–2015. Paris (France) : Disponible sur : <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publicationsnumber.htm>

Ohta, T., E. Sueoka, N. Iida, A. Komori, M. Suganuma, R. Nishiwaki, M. Tatematsu, S. J. Kim, W. W. Carmichael, et H. Fujiki. 1994. "Nodularin, a potent inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A, is a new environmental carcinogen in male F344 rat liver." *Cancer Research* 54 (24):6402-6406.

OMS (Organisation Mondiale de la Santé). 1998. "Guidelines for drinking-water quality." : Seconde édition – Volume 2 – Health Criteria and Other Supporting Information : 127p. Disponible sur : http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/2edaddvol2a.pdf

Orr, P. T., G. J. Jones, R. A. Hunter, K. Berger, D. A. De Paoli, et C. L. Orr. 2001. "Ingestion of toxic *Microcystis aeruginosa* by dairy cattle and the implications for microcystin contamination of milk." *Toxicon* 39 (12):1847-1854.

Orr, P. T., G. J. Jones, R. A. Hunter, et K. Berger. 2003. "Exposure of beef cattle to sub-clinical doses of *Microcystis aeruginosa* : toxin bioaccumulation, physiological effects and human health risk assessment." *Toxicon* 41 (5):613-620.

Pace, J. G., N. A. Robinson, G. A. Miura, C. F. Matson, T. W. Geisbert, et J. D. White. 1991. "Toxicity and kinetics of [³H]microcystin-LR in isolated perfused rat livers." *Toxicology and Applied Pharmacology* 107 (3):391-401. doi: 10.1016/0041-008X(91)90303-V.

Pan, C., Y. Chen, T. Xu, J. Wang, D. Li, et X. Han. "Chronic Exposure to Microcystin-Leucine-Arginine Promoted Proliferation of Prostate Epithelial Cells Resulting in Benign Prostatic Hyperplasia." *Environmental Pollution* 242, no. Pt B (Aug 17 2018): 1535-45.

Qin, W., X. Zhang, L. Yang, L. Xu, Z. Zhang, J. Wu, et Y. Wang. 2015. "Microcystin-LR altered mRNA and protein expression of endoplasmic reticulum stress signaling molecules related to hepatic lipid metabolism abnormalities in mice." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 40 (1):114-121. doi: 10.1016/j.etap.2015.05.002.

- Rao, P. V., N. Gupta, R. Jayaraj, A. S. Bhaskar, et P. C. Jatav. 2005. "Age-dependent effects on biochemical variables and toxicity induced by cyclic peptide toxin microcystin-LR in mice." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology* 140 (1):11-19. doi: 10.1016/j.cca.2004.11.008.
- Robinson, N. A., G. A. Miura, C. F. Matson, R. E. Dinterman, et J. G. Pace. 1989. "Characterization of chemically tritiated microcystin-LR and its distribution in mice." *Toxicon* 27 (9):1035-1042.
- Robinson, N. A., J. G. Pace, C. F. Matson, G. A. Miura, et W. B. Lawrence. 1991. "Tissue distribution, excretion and hepatic biotransformation of microcystin-LR in mice." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 256 (1):176-182.
- Rossini, G.P. 2014. *Toxins and Biologically Active Compounds from Microalgae*. Edité par Gian Paolo Rossini. Vol. 1. CRC Press.
- Runnegar, M. T., I. R. Falconer, et J. Silver. 1981. "Deformation of isolated rat hepatocytes by a peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 317 (3):268-272. doi: 10.1007/bf00503829.
- Runnegar, M. T. C., et I. R. Falconer. 1982. "The *in vivo* and *in vitro* biological effects of the peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*." *South African Journal of Science* 78 (9):363-366.
- Runnegar, M. T. C., R. G. Gerdes, et I. R. Falconer. 1991. "The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes." *Toxicon* 29 (1):43-51. doi: 10.1016/0041-0101(91)90038-S.
- Runnegar, M., N. Berndt, S. M. Kong, E. Y. Lee, et L. Zhang. 1995. "*In vivo* and *in vitro* binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A." *Biochemical and biophysical research communications* 216 (1):162-169.
- Saad, A., R. Murabat, A. Omari, et S. Al-Jassabi. 2012. "Protective role of anthocyanin and taurine against microcystin induced pancreatic and testicular toxicity in Balb/C Mice." *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences* 4 (2):72-79. doi: 10.5829/idosi.ajejts.2012.4.2.62136.
- Santé Canada. 2012. "Cyanobacterial toxins : drinking and recreational water quality guidelines."
- Santé Canada. 2016. "Recommandations pour la qualité de l'eau potable – Les toxines cyanobactériennes dans l'eau potable – Document de consultation publique", 208pp.
- Sasaki, Y. F., S. Tsuda, F. Izumiyama, et E. Nishidate. 1997. "Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay." *Mutation Research* 388 (1):33-44.
- Schaeffer, D. J., P. B. Malpas, et L. L. Barton. 1999. "Risk assessment of microcystin in dietary *Aphanizomenon flos-aquae*." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44 (1):73-80. doi: 10.1006/eesa.1999.1816.
- Schatz, D., Y. Keren, A. Vardi, A. Sukenik, S. Carmeli, T. Borner, E. Dittmann, et A. Kaplan. 2007. "Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins." *Environmental Microbiology* 9 (4):965-970. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01218.x.

- Sedan, D., L. Giannuzzi, L. Rosso, C. A. Marra, et D. Andrinolo. 2013. "Biomarkers of prolonged exposure to microcystin-LR in mice." *Toxicon* 68:9-17. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.03.002.
- Sedan, D., M. Laguens, G. Copparoni, J. O. Aranda, L. Giannuzzi, C. A. Marra, et D. Andrinolo. 2015. "Hepatic and intestine alterations in mice after prolonged exposure to low oral doses of Microcystin-LR." *Toxicon* 104:26-33. doi: 10.1016/j.toxicon.2015.07.011.
- Sekijima, M., T. Tsutsumi, T. Yoshida, T. Harada, F. Tashiro, G. Chen, S. Z. Yu, et Y. Ueno. 1999. "Enhancement of glutathione S-transferase placental-form positive liver cell foci development by microcystin-LR in aflatoxin B1-initiated rats." *Carcinogenesis* 20 (1):161-165.
- Sieroslawska, A. 2013. "Assessment of the mutagenic potential of cyanobacterial extracts and pure cyanotoxins." *Toxicon* 74:76-82. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.07.029.
- Sim, A. T., et L. M. Mudge. 1993. "Protein phosphatase activity in cyanobacteria: consequences for microcystin toxicity analysis." *Toxicon* 31 (9):1179-1186.
- Sivonen, K., et G. Jones. 1999. "Cyanobacteria Toxin Reference." *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences; Monitoring and Management*:55-124.
- Stotts, R. R., A. R. Twardock, W. M. Haschek, B. W. Choi, K. L. Rinehart, et V. R. Beasley. 1997a. "Distribution of tritiated dihydromicrocystin in swine." *Toxicon* 35 (6):937-953.
- Stotts, R. R., A. R. Twardock, G. D. Koritz, W. M. Haschek, R. K. Manuel, W. B. Hollis, et V. R. Beasley. 1997b. "Toxicokinetics of tritiated dihydromicrocystin-LR in swine." *Toxicon* 35 (3):455-465.
- Sun, Y., G. M. Meng, Z. L. Guo, et L. H. Xu. 2011. "Regulation of heat shock protein 27 phosphorylation during microcystin-LR-induced cytoskeletal reorganization in a human liver cell line." *Toxicology Letters* 207 (3):270-277. doi: 10.1016/j.toxlet.2011.09.025.
- Sun, Y., Q. Zheng, Y. T. Sun, P. Huang, Z. L. Guo, et L. H. Xu. 2014. "Microcystin-LR induces protein phosphatase 2A alteration in a human liver cell line." *Environmental Toxicology* 29 (11):1236-1244. doi: 10.1002/tox.21854.
- Sun, Y., J. H. Liu, P. Huang, Z. L. Guo, et L. H. Xu. 2015. "Alterations of tau and VASP during microcystin-LR-induced cytoskeletal reorganization in a human liver cell line." *Environmental Toxicology* 30 (1):92-100. doi: 10.1002/tox.21898.
- Svircev, Z., V. Baltic, M. Gantar, M. Jukovic, D. Stojanovic, et M. Baltic. 2010. "Molecular aspects of microcystin-induced hepatotoxicity and hepatocarcinogenesis." *Journal of Environmental Science and Health, Part C* 28 (1):39-59. doi: 10.1080/10590500903585382.
- Svoboda, M., J. Riha, K. Wlcek, W. Jaeger, et T. Thalhammer. 2011. "Organic anion transporting polypeptides (OATPs): Regulation of expression and function." *Current Drug Metabolism* 12 (2):139-153. doi: 10.2174/138920011795016863.
- Takenaka, S. 2001. "Covalent glutathione conjugation to cyanobacterial hepatotoxin microcystin LR by F344 rat cytosolic and microsomal glutathione S-transferases." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 9 (4):135-139. doi: 10.1016/S1382-6689(00)00049-1.

- Takumi, S., M. Komatsu, T. Furukawa, R. Ikeda, T. Sumizawa, H. Akenaga, Y. Maeda, K. Aoyama, K. Arizono, S. Ando, et T. Takeuchi. 2010. "p53 Plays an important role in cell fate determination after exposure to microcystin-LR." *Environmental Health Perspectives* 118 (9):1292-1298. doi: 10.1289/ehp.1001899.
- Testai, E., F. M. Buratti, E. Funari, M. Manganelli, S. Vichi, N. Arnich, R. Biré, V. Fessard, et A. Sialehaamo. 2016. "Review and analysis of occurrence, exposure and toxicity of cyanobacteria toxins in food." : European Food Safety Authority (EFSA).
- Thompson, W. L., et J. G. Pace. 1992. "Substances that protect cultured hepatocytes from the toxic effects of microcystin-LR." *Toxicology In Vitro* 6 (6):579-587.
- Torokne, A., A. Palovics, et M. Bankine. 2001. "Allergenic (sensitization, skin and eye irritation) effects of freshwater cyanobacteria--experimental evidence." *Environmental Toxicology* 16 (6):512-516.
- Ueno, Y., Y. Makita, S. Nagata, T. Tsutsumi, F. Yoshida, S. I. Tamura, M. Sekijima, F. Tashiro, T. Harada, et T. Yoshida. 1999. "No chronic oral toxicity of a low dose of microcystin-LR, a cyanobacterial hepatotoxin, in female BALB/c mice." *Environmental Toxicology* 14 (1):45-55. doi: 10.1002/(SICI)1522-7278(199902)14:1<45::AID-TOX8>3.0.CO;2-T.
- US EPA (US Environmental Protection Agency). 2006. Harmonization in Interspecies Extrapolation : Use of BW^{3/4} as a Default Method in Derivation of the Oral RfD. Risk Assessment Forum Technical Panel External review draft, EPA/630/R-06/001 : 34pp, Washington DC.
- US EPA (US Environmental Protection Agency). 2015a. " Health Effects Support Document for the Cyanobacterial Toxin Microcystins." :138p, juin 2015.
- US EPA (US Environmental Protection Agency). 2015b. "Drinking Water Health Advisory for the Cyanobacterial Microcystin Toxins." : 75p, juin 2015.
- Vichi, S., F. M. Buratti, et E. Testai. 2016. "*Microcystins: Toxicological Profile.*" Dans *Marine and Freshwater Toxins*, édité par P. Gopalakrishnakone et al. : Springer Science+Business Media Dordrecht.
- Wang, Q., P. Xie, J. Chen, et G. Liang. 2008. "Distribution of microcystins in various organs (heart, liver, intestine, gonad, brain, kidney and lung) of Wistar rat *via* intravenous injection." *Toxicon* 52 (6):721-727. doi: 10.1016/j.toxicon.2008.08.004.
- Wang, X., F. Ying, Y. Chen, et X. Han. 2012. "Microcystin (-LR) affects hormones level of male mice by damaging hypothalamic-pituitary system." *Toxicon* 59 (2):205-214. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.12.001.
- Wang, L., X. Wang, Z. Geng, Y. Zhou, Y. Chen, J. Wu, et X. Han. 2013a. "Distribution of microcystin-LR to testis of male Sprague-Dawley rats." *Ecotoxicology* 22 (10):1555-1563. doi: 10.1007/s10646-013-1141-2.
- Wang, X., Y. Chen, X. Zuo, N. Ding, H. Zeng, X. Zou, et X. Han. 2013b. "Microcystin (-LR) induced testicular cell apoptosis *via* up-regulating apoptosis-related genes *in vivo.*" *Food and Chemical Toxicology* 60:309-317. doi: 10.1016/j.fct.2013.07.039.

- Wang, X., P. Huang, Y. Liu, H. Du, X. Wang, M. Wang, Y. Wang, T. K. Hei, L. Wu, et A. Xu. 2015. "Role of nitric oxide in the genotoxic response to chronic microcystin-LR exposure in human-hamster hybrid cells." *Journal of Environmental Sciences (China)* 29:210-218. doi: 10.1016/j.jes.2014.07.036.
- Wang, C., S. Gu, X. Yin, M. Yuan, Z. Xiang, Z. Li, H. Cao, X. Meng, K. Hu, et X. Han. 2016. "The toxic effects of microcystin-LR on mouse lungs and alveolar type II epithelial cells." *Toxicol* 115:81-88. doi: 10.1016/j.toxicol.2016.03.007.
- Weng, D., Y. Lu, Y. Wei, Y. Liu, et P. Shen. 2007. "The role of ROS in microcystin-LR-induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice." *Toxicology* 232 (1-2):15-23. doi: 10.1016/j.tox.2006.12.010.
- Wu, J., S. Shao, F. Zhou, S. Wen, F. Chen, et X. Han. 2014. "Reproductive toxicity on female mice induced by microcystin-LR." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 37 (1):1-6. doi: 10.1016/j.etap.2013.10.012.
- Wu, J., M. Yuan, Y. Song, F. Sun, et X. Han. 2015. "MC-LR Exposure Leads to Subfertility of Female Mice and Induces Oxidative Stress in Granulosa Cells." *Toxins (Basel)* 7 (12):5212-5223. doi: 10.3390/toxins7124872.
- Xing, M. L., X. F. Wang, et L. H. Xu. 2008. "Alteration of proteins expression in apoptotic FL cells induced by MCLR." *Environmental Toxicology* 23 (4):451-458. doi: 10.1002/tox.20355.
- Xiong, Qian, Ping Xie, Huiying Li, Le Hao, Guangyu Li, Tong Qiu, et Ying Liu. 2009. "Involvement of Fas/FasL system in apoptotic signaling in testicular germ cells of male Wistar rats injected i.v. with microcystins." *Toxicol* 54 (1):1-7. doi: 10.1016/j.toxicol.2009.01.035.
- Xiong, Q., P. Xie, H. Li, L. Hao, G. Li, T. Qiu, et Y. Liu. 2010. "Acute effects of microcystins exposure on the transcription of antioxidant enzyme genes in three organs (Liver, kidney and testis) of Male Wistar rats." *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 24 (6):361-367.
- Xiong, X., A. Zhong, et H. Xu. 2014. "Effect of cyanotoxins on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in male adult mouse." *PLoS One* 9 (11):e106585. doi: 10.1371/journal.pone.0106585.
- Xu, P., X. X. Zhang, C. Miao, Z. Fu, Z. Li, G. Zhang, M. Zheng, Y. Liu, L. Yang, et T. Wang. 2013. "Promotion of melanoma cell invasion and tumor metastasis by microcystin-LR via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway." *Environmental Science & Technology* 47 (15):8801-8808. doi: 10.1021/es4007228.
- Xu, L., T. Li, W. Ding, Y. Cao, X. Ge, et Y. Wang. 2018. "Combined seven miRNAs for early hepatocellular carcinoma detection with chronic low-dose exposure to microcystin-LR in mice." *Science of the Total Environment* 628-629:271-281. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.02.021.
- Xue, L., J. Li, Y. Li, C. Chu, G. Xie, J. Qin, M. Yang, D. Zhuang, L. Cui, H. Zhang, et X. Fu. 2015. "N-acetylcysteine protects Chinese Hamster ovary cells from oxidative injury and apoptosis induced by microcystin-LR." *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8 (4):4911-4921.

- Yoshida, T., Y. Makita, S. Nagata, T. Tsutsumi, F. Yoshida, M. Sekijima, S. Tamura, et Y. Ueno. 1997. "Acute oral toxicity of microcystin-LR, a cyanobacterial hepatotoxin, in mice." *Natural Toxins* 5 (3):91-95. doi: 10.1002/1522-7189(1997)5:3<91::Aid-nt1>3.0.Co;2-h.
- Yoshizawa, S., R. Matsushima, M. F. Watanabe, K. Harada, A. Ichihara, W. W. Carmichael, et H. Fujiki. 1990. "Inhibition of protein phosphatases by microcystins and nodularin associated with hepatotoxicity." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 116 (6):609-614.
- Žegura, B., T. T. Lah, et M. Filipič. 2004. "The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage." *Toxicology* 200 (1):59-68. doi: 10.1016/j.tox.2004.03.006.
- Zegura, B., A. Straser, et M. Filipic. 2011. "Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review." *Mutation Research* 727 (1-2):16-41. doi: 10.1016/j.mrrev.2011.01.002.
- Zeng, J., W. W. Tu, L. Lazar, D. N. Chen, J. S. Zhao, et J. Xu. 2015. "Hyperphosphorylation of microfilament-associated proteins is involved in microcystin-LR-induced toxicity in HL7702 cells." *Environmental Toxicology* 30 (8):981-988. doi: 10.1002/tox.21974.
- Zhang, X. X., Z. Zhang, Z. Fu, T. Wang, W. Qin, L. Xu, S. Cheng, et L. Yang. 2010. "Stimulation effect of microcystin-LR on matrix metalloproteinase-2/-9 expression in mouse liver." *Toxicology Letters* 199 (3):377-382. doi: 10.1016/j.toxlet.2010.10.001.
- Zhang, X., P. Xie, D. Li, Z. Shi, J. Wang, G. Yuan, Y. Zhao, et R. Tang. 2011. "Anemia induced by repeated exposure to cyanobacterial extracts with explorations of underlying mechanisms." *Environmental Toxicology* 26 (5):472-479. doi: 10.1002/tox.20583.
- Zhang, X. X., Z. Fu, Z. Zhang, C. Miao, P. Xu, T. Wang, L. Yang, et S. Cheng. 2012. "Microcystin-LR promotes melanoma cell invasion and enhances matrix metalloproteinase-2/-9 expression mediated by NF-kappaB activation." *Environmental Science & Technology* 46 (20):11319-11326. doi: 10.1021/es3024989.
- Zhang, Z., X. X. Zhang, B. Wu, J. Yin, Y. Yu, et L. Yang. 2016. "Comprehensive insights into microcystin-LR effects on hepatic lipid metabolism using cross-omics technologies." *Journal of Hazardous Materials* 315:126-134. doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.05.011.
- Zhang, H., L. Wang, S. Shen, C. Wang, Z. Xiang, X. Han, et D. Li. 2017a. "Toxic effects of microcystin-LR on the development of prostate in mice." *Toxicology* 380:50-61. doi: 10.1016/j.tox.2017.02.004.
- Zhang, L., H. Zhang, H. Zhang, M. Benson, X. Han, et D. Li. 2017b. "Roles of piRNAs in microcystin-leucine-arginine (MC-LR) induced reproductive toxicity in testis on male offspring." *Food and Chemical Toxicology* 105:177-185. doi: 10.1016/j.fct.2017.04.014.
- Zhang, Q., W. Qin, L. Yang, J. An, X. Zhang, H. Hong, L. Xu, et Y. Wang. 2018. "Microcystis bloom containing microcystin-LR induces type 2 diabetes mellitus." *Toxicology Letters* 294:87-94. doi: 10.1016/j.toxlet.2018.05.019.

Zhao, Y., P. Xie, et H. Fan. 2012. "Genomic profiling of microRNAs and proteomics reveals an early molecular alteration associated with tumorigenesis induced by MC-LR in mice." *Environmental Science & Technology* 46 (1):34-41. doi: 10.1021/es201514h.

Zhao, S., G. Li, et J. Chen. 2015. "A proteomic analysis of prenatal transfer of microcystin-LR induced neurotoxicity in rat offspring." *Journal of Proteomics* 114:197-213. doi: 10.1016/j.jprot.2014.11.015.

Zhao, S., P. Xie, J. Chen, L. Liu, et H. Fan. 2016. "A proteomic study on liver impairment in rat pups induced by maternal microcystin-LR exposure." *Environmental Pollution* 212:197-207. doi: 10.1016/j.envpol.2015.12.055.

Zhou, Y., Y. Chen, M. Yuan, Z. Xiang, et X. Han. 2013. "In vivo study on the effects of microcystin-LR on the apoptosis, proliferation and differentiation of rat testicular spermatogenic cells of male rats injected ip with toxins." *Journal of Toxicological Sciences* 38 (5):661-670.

Zhou, M., W. W. Tu, et J. Xu. 2015. "Mechanisms of microcystin-LR-induced cytoskeletal disruption in animal cells." *Toxicol* 101:92-100. doi: 10.1016/j.toxicol.2015.05.005.

Zhou, Y., X. Geng, Y. Chen, H. Shi, Y. Yang, C. Zhu, G. Yu, et Z. Tang. 2018. "Essential roles of Akt/Snail pathway in microcystin-LR-induced tight junction toxicity in Sertoli cell." *Food and Chemical Toxicology* 112:290-298. doi: 10.1016/j.fct.2018.01.004.

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de saisine



MINISTÈRE DES AFFAIRES SOCIALES ET DE LA SANTÉ

DIRECTION GÉNÉRALE DE LA SANTÉ
Sous-direction de la prévention des risques
liés à l'environnement et à l'alimentation
Bureau Qualité des eaux
DGS/EA4 n° 284

Béatrice JÉDOR
☎ : 01.40.56.45.99
beatrice.jedor@sante.gouv.fr

Boris GARRO
☎ : 01.40.56.57.35
boris.garro@sante.gouv.fr

Paris, le 19 JUL. 2016

Le Directeur général de la santé

à

Monsieur le Directeur général
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement
et du travail
Direction de l'Évaluation des Risques
(D.E.R.) - UERE
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 MAISONS ALFORT CEDEX

OBJET : Demande d'actualisation de l'évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives

REF : DGS EA4 N° 160008 (numéro de dossier à rappeler dans toute correspondance)

En janvier 2001, le ministère chargé de la santé a saisi l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) afin d'effectuer une évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries dans les eaux destinées à la consommation humaine. En mars 2004, les ministères chargés de l'environnement et de la santé ont saisi l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset) afin de procéder à l'évaluation des risques sanitaires encourus par les baigneurs et les autres usagers des plans et cours d'eau et de proposer des valeurs limites de qualité relatives à la concentration de cellules et/ou toxines dans les eaux de baignade. En juillet 2006, les deux agences ont publié un rapport commun¹ en réponse à ces deux saisines.

S'agissant de l'eau destinée à la consommation humaine (EDCH), les recommandations de l'Afssa de juillet 2006 sont appliquées par les Agences régionales de santé (ARS) pour gérer les risques sanitaires en cas d'efflorescence de cyanobactéries dans une retenue d'eau utilisée pour produire de l'EDCH. Depuis 2004, les analyses de cyanobactéries et cyanotoxines dans les eaux utilisées pour produire de l'eau potable et dans les EDCH se sont poursuivies en métropole et dans les départements d'Outre-mer. Des cyanobactéries potentiellement toxigènes ont récemment été observées dans des retenues utilisées pour produire de l'EDCH, à Mayotte notamment : *Cylindrospermopsis*, *Planktolyngbya*, *Aphanizomenon*, *Aphanothece*, *Dolichospermum*, *Pseudanabaena*, *Oscillatoria*. Ces cyanobactéries peuvent produire des cyanotoxines (anatoxine-a, saxitoxine, cylindrospermopsine, debormalphysiatoxine, aplysiatoxine, lipopolysaccharides,...) pour lesquelles aucune donnée sur une valeur sanitaire acceptable ne figure dans le rapport précité.

S'agissant des eaux de baignade, les recommandations de l'Afsset ont été mentionnées dans différentes circulaires élaborées par mes services. En février 2015, un groupe de travail composé d'agents d'Agences régionales de santé (ARS) concernées par cette problématique a été réuni par la

¹ Évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives ; Afssa - Afsset ; Juillet 2006

DGS afin de dresser un état des lieux concernant la gestion des risques sanitaires liés à la présence de cyanobactéries dans les eaux de baignade. Bien qu'il était fait état à cette occasion d'un nombre très limité d'effets sanitaires liés aux cyanobactéries, il apparaît des difficultés de gestion importantes liées notamment aux seuils de cyanobactéries entraînant une interdiction de la baignade. Le constat a également été fait que les ARS disposent désormais de nombreuses données relatives aux cyanobactéries et cyanotoxines dans les eaux de baignade susceptibles d'apporter un éclairage sur les niveaux de contamination en cyanobactéries. Ces données n'étaient pas disponibles lorsque l'Afsset avait réalisé son évaluation des risques en 2006.

Aussi, il apparaît opportun de solliciter l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail afin d'actualiser l'expertise de 2006 à la lumière des nouvelles connaissances scientifiques et des nombreuses données d'exposition accumulées par les ARS depuis une dizaine d'années. Le contexte ultra-marin devra être pris en considération.

En regard de ces nouvelles données, je vous demande donc :

- eu égard au niveau de risque sanitaire et des moyens de gestion existants, d'actualiser les valeurs limites de qualité relatives à la concentration de cyanobactéries (dénombrement cellulaire, biovolume ou tout autre indicateur pertinent) et/ou de toxines dans les eaux destinées à l'alimentation et les eaux de baignade, en particulier pour les cylindrospermopsine et saxitoxine ;
- d'actualiser la liste des espèces de cyanobactéries toxigènes.

Par ailleurs, la disparité observée dans les laboratoires agréés s'agissant des méthodes analytiques utilisées pour le prélèvement, le dénombrement et la détermination des cyanobactéries dans les eaux destinées à la consommation humaine, à la baignade et à autres activités récréatives soulèvent des difficultés importantes en termes d'interprétation et de gestion des risques sanitaires par les ARS. Aussi, l'expertise scientifique et technique du laboratoire d'hydrologie de Nancy a été sollicitée afin de réaliser un recensement et une évaluation des méthodes de prélèvement et d'analyses pour le dénombrement et la détermination des cyanobactéries dans les EDCH, les eaux de baignade et autres eaux récréatives. Cette expertise aboutira à des recommandations à destination des laboratoires et, à terme, permettra la rédaction d'un référentiel en concertation avec les organismes de normalisation, d'accréditation et les associations de laboratoires.

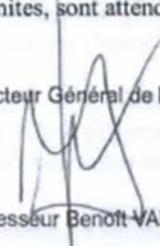
Cette saisine, qui fait partie du programme de travail 2016, est enregistrée à la Direction générale de la santé sous l'intitulé suivant :

DEMANDE D'ACTUALISATION DE L'EVALUATION DES RISQUES LIES A LA PRESENCE DE CYANOBACTERIES ET LEURS TOXINES DANS LES EAUX DESTINEES A L'ALIMENTATION, A LA BAIGNADE ET AUTRES ACTIVITES RECREATIVES

et porte le numéro : 160008.

Je vous remercie de bien vouloir me transmettre, dans les meilleurs délais, votre proposition de contrat d'expertise comprenant notamment les modalités de traitement et de restitution des travaux, dont le rendu final est attendu pour la fin du 1^{er} semestre 2018 ; des premiers éléments issus de l'expertise, en particulier l'actualisation des valeurs limites, sont attendus d'ici fin 2017.

Le Directeur Général de la Santé,


Professeur Benoît VALLET

Annexe 2 : Recherche bibliographique complémentaire sur la période 2006 - 2018

Date de la dernière consultation : 31 mai 2018

Requête SCOPUS

TITLE-ABS-KEY

(toxicokinetic OR (absorption and ADME) OR (distribution and ADME) OR metabolism OR (excretion and ADME) OR ADME OR OATP OR transporters OR intestinal OR BBB OR "blood brain barrier" OR "placental barrier" OR "glutathione transferases" OR CYP OR "cytochrome P450" OR cytotoxicity OR toxicity OR "adverse effects" OR mortality OR genotoxicity OR carcinogenicity OR "reproductive toxicity" OR neurotoxicity OR immunotoxicity OR vitro OR "in vivo" OR liver OR kidney OR sperm OR ovary OR testicles OR thyroid OR brain OR "mode of action" OR mechanism OR "short-term" OR acute OR "long-term" OR chronic)

AND

(microcystin* OR "MC-LR" OR "MC-YR" OR "MC-RR" OR "MC-AR" OR "MC-LF" OR "MC-LW" OR "MC-FR" OR "MC-deLR" or "MC-deRR" OR "MC-deLW" OR "MC-deLF" OR "MC-(O)Y" OR "MC-m[Glu(OCH₃)]-LR")

Requête PUBMED

ALL FIELDS

(toxicokinetic OR (absorption and ADME) OR (distribution and ADME) OR metabolism OR (excretion and ADME) OR ADME OR OATP OR transporters OR intestinal OR BBB OR "blood brain barrier" OR "placental barrier" OR "glutathione transferases" OR CYP OR "cytochrome P450" OR cytotoxicity OR toxicity OR "adverse effects" OR mortality OR genotoxicity OR carcinogenicity OR "reproductive toxicity" OR neurotoxicity OR immunotoxicity OR vitro OR "in vivo" OR liver OR kidney OR sperm OR ovary OR testicles OR thyroid OR brain OR "mode of action" OR mechanism OR "short-term" OR acute OR "long-term" OR chronic)

AND

(microcystin* OR "MC-LR" OR "MC-YR" OR "MC-RR" OR "MC-AR" OR "MC-LF" OR "MC-LW" OR "MC-FR" OR "MC-deLR" or "MC-deRR" OR "MC-deLW" OR "MC-deLF" OR "MC-(O)Y" OR "MC-m[Glu(OCH₃)]-LR")

Annexe 3 : Tableau récapitulatif des études de toxicité de la microcystine-LR *in vivo* par voie orale chez le rongeur

Référence de l'étude	Description de l'étude					Effets observés à une dose $\leq 40 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc.j}^{-1}$ dans l'étude	Score de l'étude avec ToxRTool
	Toxine	Animal	Voie	Doses	Durée		
Chen et al. 2011	MC-LR (pure)	Souris mâles SPF souche non indiquée (15-25g, âge non indiqué)	Eau de boisson (<i>ad libitum</i>)	1, 3.2, 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ = 0.15, 0.48, 1.5 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$	3 et 6 mois	<p>Diminution dose-dépendante de la mobilité des spermatozoïdes et de leur nombre à partir de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ à 3 et 6 mois</p> <p>Augmentation dose-dépendante des anomalies des spermatozoïdes à partir de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ à 6 mois</p> <p>Epithélium des tubules séminifères est légèrement relâché à 3.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ à 6 mois</p> <p>Légère atrophie testiculaire à 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ plus prononcée à 3.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$</p> <p>Perte et dérangement des cellules spermatiques, élargissement de la lumière des tubes séminifères, amincissement de l'épithélium des tubules séminifères, perte des cellules de Leydig et des cellules de Sertoli à 6 mois à 3.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$</p> <p>Augmentation du nombre de cellules apoptotiques à 3.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ à 3 mois et à partir de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ à 6 mois</p>	19 (1/1)
Wu et al.	MC-LR	Souris	Eau de boisson	1, 10, 40 $\mu\text{g.L}^{-1}$	3 et 6 mois	Après 3 mois d'exposition, l'atrésie des follicules	20 (1/1)

2015	(isolée, ≥95%)	femelles SPF BALB/c (4 semaines, poids non indiqué)	(pas d'information sur la quantité)	= 0.15, 1.5, 6 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$		augmente avec 6 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ tandis qu'il n'y a pas de changement dans les autres catégories et après 6 mois une accélération de l'atrésie des follicules est observée dans tous les groupes (non dose-dépendante) et les follicules primordiaux, primaires, secondaires et antraux diminuent significativement dans le groupe à 6 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Des anomalies du cycle oestral sont observées : après 3 ou 6 mois la phase estrus est raccourcie dans tous les groupes (dose-dépendant) et la durée de la phase proestrus est raccourcie dans le groupe à 6 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$; après 6 mois d'exposition une extension de la phase diestrus est observée dans tous les groupes (dose-dépendant) ; Une diminution de la fertilité est également observée : il y a une augmentation significative du taux de mortalité à la naissance dans les groupes à 1.5 et 6 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et la réduction de nombre de descendants vivants est dose et temps dépendante ; après 3 mois de traitement, une réduction significative dans le groupe à 6 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ est observée et après 6 mois une réduction significative est observée dans les groupes à 1.5 et 6 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$	
Chen <i>et al.</i> 2016	MC-LR (pure)	Souris mâles SPF BALB/c (6 semaines, poids non	Eau de boisson (pas d'information sur la quantité)	1, 10, 20, 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ = 0.15, 1.5, 3, 4.5 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$	90 jours	Epaississement des membranes du tissu testiculaire	17 (2/2)

		indiqué)					
Chen <i>et al.</i> 2017	MC-LR (pure, ≥95%)	Souris mâles SPF BALB/c (6 semaines, poids non indiqué)	Eau de boisson pas d'information sur la quantité)	1, 10, 20, 30 $\mu\text{g.L}^{-1} = 0.15,$ 1.5, 3, 4.5 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$	90 jours	Diminution du nombre de spermatozoïdes d'une manière dose-dépendante (significatif à partir de 1.5 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$) et augmentation du nombre d'anomalies des spermatozoïdes chez les souris exposées à 3 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et plus	17 (2/3)
Zhang <i>et al.</i> 2017	MC-LR (pure)	Souris enceintes SPF BALB/c (2 jours de grossesse)	Eau de boisson (<i>ad libitum</i>)	1, 10, 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ = 0.18, 1.8, 9 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$	65 jours	A 30J : 10 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ entraînent un retard du développement des ramifications d'acini et de la prolifération cellulaire dans la prostate des descendants mâles des femelles exposées; à 90J : une exposition à la MC-LR interfère avec le développement de la prostate des descendants entraînant nécrose, inflammation, hyperplasie, fibrose	16 (2/3)

Annexe 4 : Evaluation de la qualité des études de toxicité de la microcystine-LR

Reliability assessment of in vivo toxicity studies		
Study under evaluation		
Authors:		
	Chen <i>et al.</i>	
Titel:		
	Decline of sperm quality and testicular function in male mice during chronic low-dose exposure to microcystine-LR	
Testing facility, year, sponsor, study no. or bibliographic reference:		
	2011	
Explanations are available for most criteria and show up, when the cursor is moved over the criteria field. Please read carefully! Red criteria: the maximum score is needed for these criteria to achieve reliability category 1 or 2 (see worksheet Explanations): Please evaluate with special care!		
Criteria		
No.	Criteria Group I: Test substance identification	Score
1	Was the test substance identified?	1
2	Is the purity of the substance given?	1
3	Is information on the source/origin of the substance given?	1
4	Is all information on the nature and/or physico-chemical properties of the test item given, which you deem indispensable for judging the data (see explanation for examples)?	1
		4
Criteria Group II: Test organism characterisation		
5	Is the species given?	1
6	Is the sex of the test organism given?	1
7	Is information given on the strain of test animals plus, if considered necessary to judge the study, other specifications (see explanation for examples)?	1
8	Is age or body weight of the test organisms at the start of the study given?	1
9	For repeated dose toxicity studies only (give point for other study types): Is information given on the housing or feeding conditions?	0
		4
Criteria Group III: Study design description		
10	Is the administration route given?	1
11	Are doses administered or concentrations in application media given?	1
12	Are frequency and duration of exposure as well as time-points of observations explained?	1
13	Were negative (where required) and positive controls (where required) included (give point also, when absent but not required, see explanations for study types and their respective requirements on controls)?	1

14	Is the number of animals (in case of experimental human studies: number of test persons) per group given?	1
15	Are sufficient details of the administration scheme given to judge the study (see explanation for examples)?	1
16	For inhalation studies and repeated dose toxicity studies only (give point for other study types): Were achieved concentrations analytically verified or was stability of the test substance otherwise ensured or made plausible?	0
		6
	Criteria Group IV: Study results documentation	
17	Are the study endpoint(s) and their method(s) of determination clearly described?	1
18	Is the description of the study results for all endpoints investigated transparent and complete?	1
19	Are the statistical methods applied for data analysis given and applied in a transparent manner (give also point, if not necessary/applicable, see explanations)?	1
		3
	Criteria Group V: Plausibility of study design and results	
20	Is the study design chosen appropriate for obtaining the substance-specific data aimed at (see explanations for details)?	1
21	Are the quantitative study results reliable (see explanations for arguments)?	1
		2
		19
	A Numerical result leads to initial Category:	1
	B Checking red scores leads to revised Category:	1
	C Evaluator's proposal: Category:	
	D Justification in case evaluator deviates from B:	

Reliability assessment of in vivo toxicity studies	
Study under evaluation	
Authors:	
	Wu <i>et al.</i>
Titel:	
	MC-LR exposure leads to subfertility of female mice and induces oxidative stress in granulosa cells
Testing facility, year, sponsor, study no. or bibliographic reference:	
	2015
Explanations are available for most criteria and show up, when the cursor is moved over the criteria field. Please read carefully! Red criteria: the maximum score is needed for these criteria to achieve reliability category 1 or 2 (see worksheet Explanations): Please evaluate with special care!	
Criteria	

No.	Criteria Group I: Test substance identification	Score
1	Was the test substance identified?	1
2	Is the purity of the substance given?	1
3	Is information on the source/origin of the substance given?	1
4	Is all information on the nature and/or physico-chemical properties of the test item given, which you deem <u>indispensable</u> for judging the data (see explanation for examples)?	1
		4
	Criteria Group II: Test organism characterisation	
5	Is the species given?	1
6	Is the sex of the test organism given?	1
7	Is information given on the strain of test animals plus, if considered necessary to judge the study, other specifications (see explanation for examples)?	1
8	Is age or body weight of the test organisms at the start of the study given?	1
9	For repeated dose toxicity studies only (give point for other study types): Is information given on the housing or feeding conditions?	1
		5
	Criteria Group III: Study design description	
10	Is the administration route given?	1
11	Are doses administered or concentrations in application media given?	1
12	Are frequency and duration of exposure as well as time-points of observations explained?	1
13	Were negative (where required) and positive controls (where required) included (give point also, when absent but not required, see explanations for study types and their respective requirements on controls)?	1
14	Is the number of animals (in case of experimental human studies: number of test persons) per group given?	1
15	Are sufficient details of the administration scheme given to judge the study (see explanation for examples)?	0
16	For inhalation studies and repeated dose toxicity studies only (give point for other study types): Were achieved concentrations analytically verified or was stability of the test substance otherwise ensured or made plausible?	1
		6
	Criteria Group IV: Study results documentation	
17	Are the study endpoint(s) and their method(s) of determination clearly described?	1
18	Is the description of the study results for all endpoints investigated transparent and complete?	1
19	Are the statistical methods applied for data analysis given and applied in a transparent manner (give also point, if not necessary/applicable, see explanations)?	1
		3
	Criteria Group V: Plausibility of study design and results	
20	Is the study design chosen appropriate for obtaining the substance-specific data aimed at (see explanations for details)?	1
21	Are the <u>quantitative</u> study results reliable (see explanations for arguments)?	1
		2
		20
	A Numerical result leads to initial Category:	1

	B Checking red scores leads to revised Category:	1
	C Evaluator's proposal: Category:	
	D Justification in case evaluator deviates from B:	

Reliability assessment of in vivo toxicity studies		
Study under evaluation		
Authors:		
	Chen <i>et al.</i>	
Titel:		
	Microcystin-Leucine Arginine causes cytotoxic effects in sertoli cells resulting in reproductive dysfunction in male mice	
Testing facility, year, sponsor, study no. or bibliographic reference:		
	2016	
Explanations are available for most criteria and show up, when the cursor is moved over the criteria field. Please read carefully! Red criteria: the maximum score is needed for these criteria to achieve reliability category 1 or 2 (see worksheet Explanations): Please evaluate with special care!		
Criteria		
No.	Criteria Group I: Test substance identification	Score
1	Was the test substance identified?	1
2	Is the purity of the substance given?	0
3	Is information on the source/origin of the substance given?	1
4	Is all information on the nature and/or physico-chemical properties of the test item given, which you deem <u>indispensable</u> for judging the data (see explanation for examples)?	1
		3
Criteria Group II: Test organism characterisation		
5	Is the species given?	1
6	Is the sex of the test organism given?	1
7	Is information given on the strain of test animals plus, if considered necessary to judge the study, other specifications (see explanation for examples)?	1
8	Is age or body weight of the test organisms at the start of the study given?	1
9	For repeated dose toxicity studies only (give point for other study types): Is information given on the housing or feeding conditions?	0
		4
Criteria Group III: Study design description		
10	Is the administration route given?	1
11	Are doses administered or concentrations in application media given?	1
12	Are frequency and duration of exposure as well as time-points of observations explained?	1

13	Were negative (where required) and positive controls (where required) included (give point also, when absent but not required, see explanations for study types and their respective requirements on controls)?	1
14	Is the number of animals (in case of experimental human studies: number of test persons) per group given?	1
15	Are sufficient details of the administration scheme given to judge the study (see explanation for examples)?	0
16	For inhalation studies and repeated dose toxicity studies only (give point for other study types): Were achieved concentrations analytically verified or was stability of the test substance otherwise ensured or made plausible?	0
		5
	Criteria Group IV: Study results documentation	
17	Are the study endpoint(s) and their method(s) of determination clearly described?	1
18	Is the description of the study results for all endpoints investigated transparent and complete?	1
19	Are the statistical methods applied for data analysis given and applied in a transparent manner (give also point, if not necessary/applicable, see explanations)?	1
		3
	Criteria Group V: Plausibility of study design and results	
20	Is the study design chosen appropriate for obtaining the substance-specific data aimed at (see explanations for details)?	1
21	Are the quantitative study results reliable (see explanations for arguments)?	1
		2
		17
	A Numerical result leads to initial Category:	2
	B Checking red scores leads to revised Category:	2
	C Evaluator's proposal: Category:	
	D Justification in case evaluator deviates from B:	

Reliability assessment of in vivo toxicity studies		
Study under evaluation		
Authors:		
	Zhang <i>et al.</i>	
Title:		
	Toxic effects of microcystin-LR on the development of prostate in mice	
Testing facility, year, sponsor, study no. or bibliographic reference:		
	2017	
Explanations are available for most criteria and show up, when the cursor is moved over the criteria field.		

Please read carefully! Red criteria: the maximum score is needed for these criteria to achieve reliability category 1 or 2 (see worksheet Explanations): Please evaluate with special care!		
Criteria		
No.	Criteria Group I: Test substance identification	Score
1	Was the test substance identified?	1
2	Is the purity of the substance given?	0
3	Is information on the source/origin of the substance given?	1
4	Is all information on the nature and/or physico-chemical properties of the test item given, which you deem <u>indispensable</u> for judging the data (see explanation for examples)?	1
		3
Criteria Group II: Test organism characterisation		
5	Is the species given?	1
6	Is the sex of the test organism given?	1
7	Is information given on the strain of test animals plus, if considered necessary to judge the study, other specifications (see explanation for examples)?	1
8	Is age or body weight of the test organisms at the start of the study given?	0
9	For repeated dose toxicity studies only (give point for other study types): Is information given on the housing or feeding conditions?	1
		4
Criteria Group III: Study design description		
10	Is the administration route given?	1
11	Are doses administered or concentrations in application media given?	1
12	Are frequency and duration of exposure as well as time-points of observations explained?	1
13	Were negative (where required) and positive controls (where required) included (give point also, when absent but not required, see explanations for study types and their respective requirements on controls)?	1
14	Is the number of animals (in case of experimental human studies: number of test persons) per group given?	0
15	Are sufficient details of the administration scheme given to judge the study (see explanation for examples)?	1
16	For inhalation studies and repeated dose toxicity studies only (give point for other study types): Were achieved concentrations analytically verified or was stability of the test substance otherwise ensured or made plausible?	0
		5
Criteria Group IV: Study results documentation		
17	Are the study endpoint(s) and their method(s) of determination clearly described?	1
18	Is the description of the study results for all endpoints investigated transparent and complete?	1
19	Are the statistical methods applied for data analysis given and applied in a transparent manner (give also point, if not necessary/applicable, see explanations)?	1
		3
Criteria Group V: Plausibility of study design and results		
20	Is the study design chosen appropriate for obtaining the substance-specific data aimed at (see explanations for details)?	0
21	Are the <u>quantitative</u> study results reliable (see explanations for arguments)?	1

		1
		16
	A Numerical result leads to initial Category:	2
	B Checking red scores leads to revised Category:	3
	C Evaluator's proposal: Category:	
	D Justification in case evaluator deviates from B:	

Reliability assessment of in vivo toxicity studies		
Study under evaluation		
Authors:		
	Chen <i>et al.</i>	
Title:		
	Microcystin-leucine arginine exhibits immunomodulatory roles in testicular cells resulting in orchitis	
Testing facility, year, sponsor, study no. or bibliographic reference:		
	2017	
<p>Explanations are available for most criteria and show up, when the cursor is moved over the criteria field. Please read carefully!</p> <p>Red criteria: the maximum score is needed for these criteria to achieve reliability category 1 or 2 (see worksheet Explanations): Please evaluate with special care!</p>		
Criteria		
No.	Criteria Group I: Test substance identification	Score
1	Was the test substance identified?	1
2	Is the purity of the substance given?	1
3	Is information on the source/origin of the substance given?	1
4	Is all information on the nature and/or physico-chemical properties of the test item given, which you deem <u>indispensable</u> for judging the data (see explanation for examples)?	1
		4
Criteria Group II: Test organism characterisation		
5	Is the species given?	1
6	Is the sex of the test organism given?	1
7	Is information given on the strain of test animals plus, if considered necessary to judge the study, other specifications (see explanation for examples)?	1
8	Is age or body weight of the test organisms at the start of the study given?	1
9	For repeated dose toxicity studies only (give point for other study types): Is information given on the housing or feeding conditions?	0
		4
Criteria Group III: Study design description		

10	Is the administration route given?	1
11	Are doses administered or concentrations in application media given?	1
12	Are frequency and duration of exposure as well as time-points of observations explained?	1
13	Were negative (where required) and positive controls (where required) included (give point also, when absent but not required, see explanations for study types and their respective requirements on controls)?	1
14	Is the number of animals (in case of experimental human studies: number of test persons) per group given?	1
15	Are sufficient details of the administration scheme given to judge the study (see explanation for examples)?	0
16	For inhalation studies and repeated dose toxicity studies only (give point for other study types): Were achieved concentrations analytically verified or was stability of the test substance otherwise ensured or made plausible?	0
		5
	Criteria Group IV: Study results documentation	
17	Are the study endpoint(s) and their method(s) of determination clearly described?	1
18	Is the description of the study results for all endpoints investigated transparent and complete?	1
19	Are the statistical methods applied for data analysis given and applied in a transparent manner (give also point, if not necessary/applicable, see explanations)?	1
		3
	Criteria Group V: Plausibility of study design and results	
20	Is the study design chosen appropriate for obtaining the substance-specific data aimed at (see explanations for details)?	0
21	Are the <u>quantitative</u> study results reliable (see explanations for arguments)?	1
		1
		17
	A Numerical result leads to initial Category:	2
	B Checking red scores leads to revised Category:	3
	C Evaluator's proposal: Category:	
	D Justification in case evaluator deviates from B:	

Annexe 5 : Modélisation d'une Benchmark Dose pour la microcystine-LR à partir de données issues de l'étude de Chen *et al.* (2011)

L'étude de Chen *et al.* (2011) permet d'identifier plusieurs relations dose-réponse entre la baisse du nombre de spermatozoïdes, la baisse de la mobilité spermatique et l'exposition quotidienne à la MC-LR durant 3 et 6 mois. Une augmentation dose-dépendante des anomalies spermatiques est également observée lors d'une exposition quotidienne de 6 mois à la toxine.

Ces relations ont été modélisées à l'aide du logiciel proposé par l'EFSA (EFSA, 2017) qui utilise Proast (Proast software version 65,7) élaboré par le RIVM pour élaborer une Benchmark Dose (BMD). Dans la mesure où les effets sur la reproduction sont observés dès 3 mois d'exposition, seules ces données ont été exploitées :

Analyses quantitatives de la qualité spermatique des souris après 3 mois d'exposition à la MC-LR via l'eau de boisson (Chen *et al.*, 2011)

	Contrôle (N = 10)	1 µg/L (N = 10)	3,2 µg/L (N = 10)	10 µg/L (N = 10)
Nombre de spermatozoïdes (x 10 ⁶ mL ⁻¹)	27,0 ± 1,5	23,5 ± 0,8	17,8 ± 1,5**	13,3 ± 1,3**
Mobilité spermatique (%)	71,7 ± 3,3	57,6 ± 5,5	54,0 ± 6,4*	34,6 ± 3,3**
Anomalies spermatiques (%)	5,9 ± 1,0	5,9 ± 1,0	6,1 ± 0,9	6,5 ± 1,0

Les données représentent la moyenne ± écart-standard, avec écart type = erreur standard x N^{1/2}, * significatif p<0,05 ** significatif p<0,01 par rapport au contrôle

L'objectif de la démarche est d'estimer la dose correspondant à un niveau de réponse défini ou à un pourcentage défini de réponse supplémentaire par rapport au témoin. Ce niveau ou ce pourcentage est appelé BMR pour Benchmark Response. S'agissant de variables continues (mesure d'une variable biologique), l'une des principales difficultés lors de la construction d'une BMDL concerne le choix de la BMR (Benchmark Response level), c'est-à-dire le choix de la modification maximale tolérée comme étant physiologique (ou non néfaste) pour le paramètre étudié.

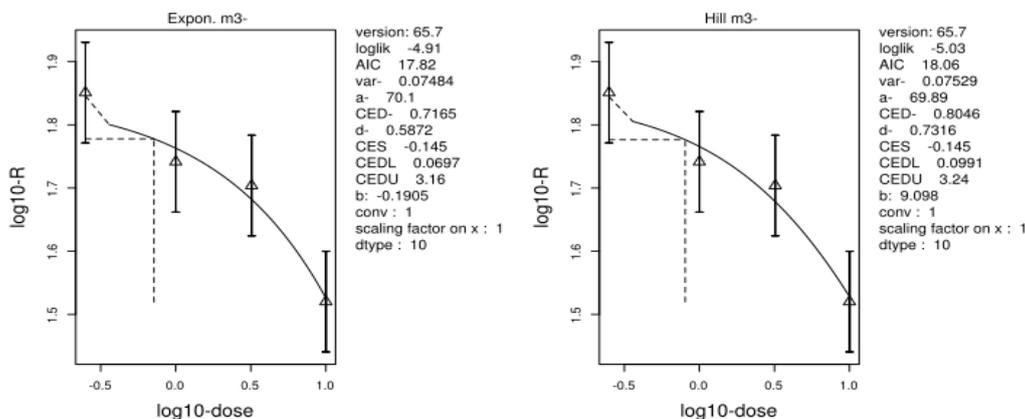
Selon l'US EPA (US EPA, 2012) (pour un effet critique portant sur l'augmentation et/ou la diminution d'une donnée continue), il est recommandé que le BMR corresponde à la moyenne du groupe contrôle +/- un écart-type du groupe témoin ce qui a conduit dans l'étude de Chen *et al.* (2011) à retenir comme BMR une diminution de 14,5 % de la mobilité spermatique ou de 17,5 % du nombre de spermatozoïde par rapport au groupe témoin. Le niveau de confiance associé à la BMDL est de 90% (one side/ unilatéral).

Lors de la détermination de la BMDL, plusieurs modèles mathématiques ont été testés. Le modèle qui a été sélectionné est celui proposant la BMDL la plus basse, autrement dit la plus protectrice. Il s'agit ici du modèle exponentiel qui a été retenu pour l'estimation de la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% d'une dose correspondant à la diminution de la mobilité spermatique de 14,5% de la réponse par rapport au groupe non exposé (Figure 3).

Résumé des données modélisées

Effet		Nombre de spermatozoïdes	Mobilité spermatique
BMR (%) (Correspondant à la moyenne du groupe contrôle – 1 x écart-type* du groupe contrôle)		17,5%	14,5 %
BMD (µg/L)	Exponentiel	0,94	0,72
	Hill	1,03	0,80
BMDL (µg/L)	Exponentiel	0,264	0,07
	Hill	0,343	0,099

*Avec écart type = erreur standard x N^{1/2}



Modélisation de la diminution de la mobilité spermatique lors d'une exposition à la MC-LR

La limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% de la BMD construite sur la diminution de la qualité spermatique pour un niveau d'effet correspondant à une diminution de 14,5% du niveau d'effet observé par rapport au groupe témoin en fonction de la mobilité spermatique car il s'agit de la BMDL la plus faible.

BMDL = 0,07 µg/L

Notes





Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
14 rue Pierre et Marie Curie
F94701 Maisons-Alfort cedex
www.anses.fr
[@Anses_fr](https://twitter.com/Anses_fr)